



**HAL**  
open science

# Isolement, identification et caractérisation de gènes impliqués dans la maturation de l'abricot (*Prunus armeniaca* L.)

Didier Mbéguié-A-Mbéguié

► **To cite this version:**

Didier Mbéguié-A-Mbéguié. Isolement, identification et caractérisation de gènes impliqués dans la maturation de l'abricot (*Prunus armeniaca* L.). Ingénierie des aliments. Université Paul Cézanne (Aix Marseille 3), 2000. Français. NNT: . tel-02840425

**HAL Id: tel-02840425**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02840425>**

Submitted on 7 Jun 2020

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

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

***Isolement, Identification et Caractérisation de gènes  
impliqués dans la maturation de l'abricot (Prunus  
armeniaca L.)***

**THESE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE DROIT, D'ECONOMIE ET DES SCIENCES  
D'AIX-MARSEILLE**

*Discipline : Nutrition, aspects cellulaires et moléculaires*

Présentée et soutenue publiquement par

**Didier MBEGUIE-A-MBEGUIE**

**Le 10 Avril 2000**

**M A. PUIGSERVER**

**M J.C. PECH**

**M G. LEDOIGT**

**M G. ALBAGNAC**

**M B. R. FILS-LYCAON**

**M F. BAKRY**

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

## REMERCIEMENTS

*L'ensemble des travaux présentés dans ce mémoire a été réalisé à la station de Technologie des Produits Végétaux de l'INRA d'Avignon. Je remercie M. Guy ALBAGNAC, directeur de la station, pour son accueil au sein de la station de Technologie.*

*Je remercie les différents membres du jury : Monsieur le Professeur A. PUIGSERVER d'avoir accepté de présider mon jury de thèse, Messieurs les Professeurs J.C. PECH et G. LEDOIGT les rapporteurs, Messieurs G. ALBAGNAC, B.R. FILS-LYCAON et F. BAKRY les examinateurs.*

*J'exprime ma gratitude à Bernard FILS-LYCAON, mon maître de stage, pour avoir suivi constamment et activement la progression de mon travail de thèse. Merci Bernie pour m'avoir fait confiance et surtout cru en moi. Nos discussions parfois animées ont toujours été constructives et vraies. Tes connaissances, ta participation active, tes critiques et tes conseils, ta patience et ta disponibilité durant tout le temps passé ensemble ont énormément inspiré mon évolution professionnelle et humaine.*

*Je remercie également Monsieur Jean Marc AUDERGON pour sa disponibilité et son écoute. Les nombreuses discussions autour de mon sujet de thèse m'ont été précieuses pour l'avancement de mon travail.*

*Ce travail n'aurait pas atteint son ampleur sans la contribution de :*

*- Rose-Marie Gomez pour l'aide précieuse qu'elle m'a apportée dans les 6 premiers mois de ma thèse.*

*- Barbara Gouble et l'équipe des mesures physiques. Les données constamment mises à ma disposition m'ont été précieuses dans la progression de mon travail. Un merci tout particulier à Barbara pour sa disponibilité et son aide permanentes lors de mes apparitions souvent imprévisibles.*

*- L'équipe de biologie moléculaire de la maturation de la fraise : Corinne Douat, Line Tichit et Isabelle Marty. Je vous suis reconnaissant pour toutes les discussions et les échanges enrichissants que nous avons eus pendant tout mon séjour à la station de Technologie.*

*- L'équipe du LAMPE, en particulier les « cousins » Loonis Dominique et Pietri Eric, pour toute votre aide lors du traitement informatique des données.*

*Je remercie également « la cousine » Madame Maggy Grotte, Messieurs Guy ALBAGNAC, Jean Marc AUDERGON et Bernard FILS-LYCAON pour avoir accepté de relire ce mémoire.*

*Je remercie l'ensemble des thésards de la station de Technologie des Produits Végétaux Braconnier Agnès, Chahine Hala, Choma Caroline, Del Campo José, De Rigal David et Douat Corinne, pour le soutien quotidien vécu, jour après jour, pendant l'aventure de nos thèses.*

*Ma reconnaissance va également à tous « les cousins et cousines », membres de la station de Technologie, qui m'ont entouré pendant toute la durée de ma thèse. Leurs conseils et leur soutien ont contribué à la réussite de ce travail, et m'ont permis de garder le moral dans les moments difficiles.*

*A Anne-Marie et Mamie, mes amis d'Auvergne Justin, Martin et Corinne, Pierre, Anne, Cécile, Bruno, Olivier et Valérie, Nathalie et Sébastien, Sophie, Florence, Christelle, et mon épouse Corinne. Merci pour m'avoir aidé, soutenu et facilité mon intégration depuis mon arrivée en France. Si j'en suis là c'est grâce à vous. Je vous dois beaucoup.*

*« Last but not least », je remercie ma famille pour son soutien permanent malgré la distance, et pour avoir toujours respecté mes choix, pas forcément évidents. Loin des yeux, près du cœur...*

Les résultats du travail présenté dans ce mémoire ont donné lieu aux publications suivantes :

**Articles originaux parus ou soumis dans revues à comité de lecture:**

- 1) Mbéguié-A-Mbéguié D., Chahine H., Gomez R.-M., Gouble B., Reich M., Audergon J.-M., Souty M., Albagnac G., Fils-Lycaon B. 1999. Molecular cloning and expression of a cADN encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase from apricot fruit (*Prunus armeniaca*). *Physiologia Plantarum* 105 : 294-303
- 2) Chevalier T., De Rigal D., Mbéguié-A-Mbéguié D., Gauillard F., Forget-Richard F., Fils-Lycaon B. 1999. Molecular Cloning and Characterization of Apricot Fruit Polyphenol Oxidase isolated from apricot fruit (*Prunus armeniaca* cv. bergeron). *Plant Physiology* 119 : 1261-1269
- 3) Mbéguié-A-Mbéguié D., Gouble B., Audergon JM, Gomez RM, Albagnac G, Fils-Lycaon BR 2000. Cloning of Two cDNA Clones Encoding Two Different Expansins From Apricot Fruit (*Prunus armeniaca*). Gene Expression During Fruit Ripening and After Post-harvest Treatments by Air, Carbon Dioxide, Ethylene, and 1-Methyl Cyclopropène. Soumis pour publication à *Plant Physiology*

**Notes parues dans revues à comité de lecture:**

- 1) Mbéguié-A-Mbéguié D., Gomez R.-M., Fils-Lycaon B., 1997. Sequence of an O-Methyltransferase from Apricot Fruit (Accession No. U82011). Gene Expression During Fruit Ripening (PGR97-118). *Plant Physiol.* 114: 1569
- 2) Mbéguié-A-Mbéguié D., Gomez R.-M., Fils-Lycaon B., 1997. Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of a Metallothionein-like Protein From Apricot Fruit (Accession No. U97494). Gene Expression During Fruit Ripening (PGR97-160). *Plant Physiol.*, 115 :1288
- 3) Mbéguié-A-Mbéguié D., Gomez R.-M., Fils-Lycaon B., 1997. Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of an Abscisic Acid-, Stress-, Ripening-Induced (ASR) -Like Protein From Apricot Fruit (Accession No. U93164). Gene Expression During Fruit Ripening (PGR97-166). *Plant Physiol.*, 115 :1288
- 4) Mbéguié-A-Mbéguié D., Gomez R.-M., Fils-Lycaon B., 1997. Sequence of AFTP1, a Cysteine Proteinase From Apricot Fruit (Accession No. U93166). Gene Expression During Fruit Ripening (PGR97-179). *Plant Physiol.*, 115: 1730
- 5) Mbéguié-A-Mbéguié D., Gomez R.-M., Fils-Lycaon B., 1997. Sequence of an Allergen-, Stress-, and Pathogenesis-related Protein From Apricot Fruit (Accession No. U93165). Gene Expression During Fruit Ripening (PGR97-180). *Plant Physiol.* 115: 1730
- 6) Mbéguié-A-Mbéguié D. et Fils-Lycaon B. 2000. Molecular Cloning and Nucleotide Sequences of PA-ZE (Accession No. AF071888) and PA-ZE2 (Accession No. AF159948), Two cDNAs From Apricot Fruit

Coding For a Zeaxanthin Epoxidase. Gene Expression During Fruit Ripening. (PGR00-004). Plant Physiol. (accepté pour publication)

**Participation et Communications sous forme de posters dans congrès nationaux et internationaux :**

- 1) Mbéguié-A-Mbéguié D., Chahine H., Gomez R.-M., Gouble B., Audergon J.-M., Souty M., Albagnac G., Fils-Lycaon B. 1997. Cloning and expression of a cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase from apricot fruit. **Poster**, 3<sup>o</sup> Colloque de la Société Française de Physiologie Végétale, Toulouse, 1-3 Decembre, FRANCE.
- 2) Mbéguié-A-Mbéguié D., Gomez R.-M., Fils-Lycaon B., 1997. Cloning and characterization of cADN isolated from ripe apricot fruit (*Prunus armeniaca*). **Poster**, Journées de l'école Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé des Universités d'Aix-Marseille. Marseille, 26-27 Mai.
- 3) Chevallier T., De Rigal D., Mbéguié-A-Mbéguié D., Gaillard F., Forget-Richard F., Fils-Lycaon B. 1998. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding polyphenol oxidase isolated from apricot fruit (*Prunus armeniaca* cv. bergeron). **Poster**, Gordon Research Conference, Postharvest Physiology, Playsmouth, 12-17 Juillet. USA

# SOMMAIRE

	<u>Pages</u>
<b><i>Abréviations</i></b>	1
<b><i>Avant-propos</i></b>	2-3
<b><i>Etude bibliographique</i></b>	4-25
<b>I - <u>L'ABRICOT</u></b>	4
I - 1 - <u>L'anatomie du fruit</u>	4
I - 2 - <u>Composition et caractéristiques nutritionnelles du fruit</u>	4
I - 3 - <u>Les étapes du développement du fruit</u>	5
I - 3 - 1 - <u>La croissance</u>	5
I - 3 - 2 - <u>La maturation</u>	6
⇒ <u>Les fruits climactériques (F.C.) et les fruits non climactériques (F.N.C.)</u>	
⇒ <u>La maturation de l'abricot</u>	
<b>II - <u>QUELQUES DONNEES PHYSICO-CHIMIQUES SUR LA MATURATION DE L'ABRICOT SUR L'ARBRE ET EN POST-RECOLTE</u></b>	6
II - 1 - <u>Evolution de Bergeron sur l'arbre et après les traitements post-récolte</u>	7
II - 1 - 1 - <u>Maturation de Bergeron sur l'arbre</u>	7
II - 1 - 2 - <u>Effet du CO<sub>2</sub> sur la maturation de Bergeron</u>	7
II - 2 - <u>Evolution de Moniqui sur l'arbre et après les traitements post-récolte</u>	7
II - 2 - 1 - <u>Maturation de Moniqui sur l'arbre</u>	7
II - 2 - 2 - <u>Effet de l'éthylène et du 1-MCP sur la maturation de Moniqui</u>	8
<b>III - <u>LA BIOSYNTHESE DE L'ETHYLENE</u></b>	9
III - 1 - <u>L'ACC Synthase (EC 4.4.1.14)</u>	11
III - 2 - <u>L'ACC Oxydase (EC 1.4.3)</u>	12

<b>IV - <u>LA REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DE L'ETHYLENE</u></b>	<b>14</b>
<b>IV - 1 - <u>Le rétro-contrôle positif de la biosynthèse de l'éthylène : la régulation des gènes d'ACC oxydase et d'ACC synthase par l'éthylène</u></b>	<b>14</b>
<b>IV - 2 - <u>Le rétro-contrôle négatif de la biosynthèse de l'éthylène</u></b>	<b>15</b>
IV - 2 - 1 - <u>Le contrôle du niveau d'ACC cellulaire par l'éthylène</u>	<b>15</b>
⇒ <u>L'inhibition des gènes d'ACC synthase</u>	
⇒ <u>La conversion de l'ACC disponible en produit de fin de chaîne</u>	
IV - 2 - 2 - <u>La protéine E8</u>	<b>16</b>
<b>IV - 3 - <u>Autre forme de régulation de la biosynthèse de l'éthylène</u></b>	<b>17</b>
<b>V - <u>MODE D'ACTION DE L'ETHYLENE</u></b>	<b>17</b>
<b>V - 1 - <u>Transduction du signal éthylénique</u></b>	<b>17</b>
<b>V - 2 - <u>L'éthylène et la régulation de l'expression génique</u></b>	<b>19</b>
<b>VI - <u>LES INHIBITEURS SYNTHETIQUES DE L'ETHYLENE</u></b>	<b>20</b>
<b>VII - <u>L'ETHYLENE ET LA MATURATION DES FRUITS</u></b>	<b>21</b>
<b>VII - 1 - <u>Rôle de l'éthylène dans le processus de maturation des F.C.</u></b>	<b>21</b>
<b>VII - 2 - <u>Les voies métaboliques dépendantes et indépendantes de l'éthylène</u></b>	<b>22</b>
VII - 2 - 1 - <u>Maturation et perte de fermeté</u>	<b>22</b>
VII - 2 - 2 - <u>La maturation et le changement de couleur</u>	<b>23</b>
VII - 2 - 3 - <u>Autres métabolismes associés au processus de maturation</u>	<b>24</b>
<b><i>Matériel et Méthodes</i></b>	<b>26-48</b>
<b><u>Matériel végétal</u></b>	<b>26-29</b>
<b>I - <u>RECOLTE, ECHANTILLONNAGE ET TRAITEMENTS DES FRUITS</u></b>	<b>26</b>
<b>I - 1 - <u>Récolte et échantillonnage des fruits</u></b>	<b>26</b>

<b>II - 2 - <u>Traitements des fruits</u></b>	<b>26</b>
II - 2 - 1 - <u>Traitement des fruits au CO2</u>	27
II - 2 - 2 - <u>Traitements des fruits à l'éthylène et au 1-MCP</u>	27
<b>II - <u>MESURES DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DES FRUITS</u></b>	<b>28</b>
<b>II - 1 - <u>Mesure de la perte de fermeté</u></b>	<b>28</b>
<b>II - 2 - <u>Mesure du dégagement éthylénique</u></b>	<b>28</b>
<b>II - 3 - <u>Mesure de l'évolution de la coloration</u></b>	<b>28</b>
<b><u>Méthodes de biologie moléculaire</u></b>	
	<b>29-48</b>
<b>I - <u>MÉTHODES RELATIVES AUX ACIDES NUCLEIQUES</u></b>	<b>29</b>
<b>I - 1 - <u>Extraction et purification des acides nucléiques</u></b>	<b>29</b>
I - 1 - 1 - <u>Extraction et purification d'ARN totaux</u>	29
I - 1 - 2 - <u>Purification des ARN messagers</u>	30
I - 1 - 3 - <u>Extraction et purification d'ADN génomique</u>	30
I - 1 - 4 - <u>Extraction et purification d'ADN plasmidique</u>	30
<b>I - 2 - <u>Analyses quantitative et qualitative des acides nucléiques</u></b>	<b>31</b>
I - 2 - 1 - <u>Analyse quantitative des acides nucléiques</u>	31
I - 2 - 2 - <u>Analyse qualitative des acides nucléiques</u>	31
⇒ <u>L'électrophorèse en conditions non dénaturantes</u>	
⇒ <u>L'électrophorèse en conditions dénaturantes</u>	
<b>I - 3 - <u>Synthèse <i>in vitro</i> de l'ADN</u></b>	<b>33</b>
I - 3 - 1 - <u>Considérations générales</u>	33
I - 3 - 2 - <u>Méthode de recherche d'une amorce spécifique et dégénérée : exemple de l'amorce ACCS-CS</u>	34
I - 3 - 3 - <u>La réaction de polymérisation en chaîne (PCR)</u>	35
I - 3 - 4 - <u>La transcription inverse (RT)</u>	35
I - 3 - 5 - <u>Amplification de l'extrémité 3' des ADNc rares (3'RACE)</u>	36
<b>I - 4 - <u>Purification des acide nucléiques synthétisés <i>in vitro</i></u></b>	<b>36</b>



I - 4 - 1 - <u>La méthode de purification enzymatique</u>	37
I - 4 - 2 - <u>La méthode de purification par précipitation différentielle</u>	37
I - 4 - 3 - <u>La méthode de purification par chromatographie d'affinité</u>	38
<b>I - 5 - <u>Clonage et sous-clonage des fragments d'ADNc</u></b>	<b>38</b>
I - 5 - 1 - <u>Le clonage des fragments d'ADNc</u>	38
I - 5 - 2 - <u>Le sous-clonage des fragments d'ADNc : l'excision <i>in vivo</i> de phage</u>	39
I - 5 - 3 - <u>Transformation bactérienne</u>	39
I - 5 - 4 - <u>Analyse des clones bactériens transformés et positifs</u>	40
⇒ <u>Détection de l'insert par amplification <i>in vitro</i> du site de clonage</u>	
⇒ <u>Détection de l'insert par digestion du plasmide</u>	
<b>I - 6 - <u>Hybridation moléculaire des acides nucléiques</u></b>	<b>41</b>
I - 6 - 1 - <u>Séparation et transfert des ARN totaux sur membrane</u>	41
I - 6 - 2 - <u>Digestion, séparation et transfert des fragments ADN sur membrane</u>	42
⇒ <u>La digestion et séparation des fragments d'ADN</u>	
⇒ <u>Transferts des fragments d'ADN sur membrane</u>	
I - 6 - 3 - <u>Préhybridation, hybridation et lavages des membranes</u>	42
⇒ <u>Préhybridation</u>	
⇒ <u>Obtention et marquage de la sonde froide</u>	
⇒ <u>Hybridation et lavages</u>	
<b>I - 7 - <u>Construction et criblage d'une banque d'ADN complémentaires</u></b>	<b>44</b>
I - 7 - 1 - <u>Construction de la banque d'ADN complémentaires</u>	44
I - 7 - 2 - <u>Criblage de la banque d'ADN complémentaires</u>	44
I - 7 - 3 - <u>Détermination de la taille de l'insert du clone isolé</u>	45
<b>II - <u>TRAITEMENT DE DONNEES : IDENTIFICATION D'UN GENE</u></b>	<b>45</b>
<b>II - 1- <u>Séquencage de gène</u></b>	<b>45</b>
<b>II - 2- <u>Analyse de la séquence du gène</u></b>	<b>46</b>
<b>III - <u>METHODES RELATIVES AUX PROTEINES</u></b>	<b>46</b>
<b>III -1- <u>Extraction de protéines totales</u></b>	<b>46</b>

III - 2 - <u>Dosage des protéines totales</u>	47
III - 3 - <u>Séparation des protéines totales par électrophorèse SDS-PAGE</u>	47
III - 4 - <u>Transfert des protéines totales sur membrane</u>	47
III - 5 - <u>Détection immunochimique de protéine sur membrane</u>	48
<b><i>Résultats et Discussion</i></b>	49-78
<b><i><u>Isolement des gènes exprimés dans le fruit</u></i></b>	49-57
<b><u>I - LES GENES IMPLIQUES DANS LA BIOSYNTHESE DE L'ETHYLENE</u></b>	50
I - 1 - <u>Les gènes d'ACC synthase d'abricot</u>	50
I - 2 - <u>Le gène d'ACC oxydase d'abricot</u>	51
I - 3 - <u>Le gène <i>p69RF</i> d'abricot</u>	52
<b><u>II - LES GENES IMPLIQUES DANS LA PERTE DE FERMETE</u></b>	53
II - 1 - <u>Le gène <i>PA-PME</i> codant pour la pectinéméthylesterase (PME) d'abricot</u>	53
II - 2 - <u>Le gène <i>PA-βGAL</i> codant pour la β-Galactosidase (β-Gal) d'abricot</u>	54
II - 3 - <u>Les gènes <i>PA-EXP1</i> et <i>PA-EXP2</i> codant pour les Expansines d'abricot</u>	54
<b><u>III - LES GENES IMPLIQUES DANS D'AUTRES METABOLISMES</u></b>	55
<b><i><u>Caractérisation des gènes de la biosynthèse de l'éthylène</u></i></b>	58-74
<b><u>I - LES GENES D'ACC SYNTHASE D'ABRICOT</u></b>	58
I - 1 - <u><i>PA-ACSI</i> et <i>PA-ACS2</i> présentent des profils d'expression différents pendant le développement du fruit</u>	59
I - 2 - <u>Effet des traitements post-récoltes sur l'expression des gènes <i>PA-ACSI</i> et <i>PA-ACS2</i></u>	62
I - 2 - 1 - <u>Effet de l'éthylène et du 1-MCP sur l'expression des gènes <i>PA-ACSI</i> et <i>PA-ACS2</i></u>	62
I - 2 - 2 - <u>Effet du CO<sub>2</sub> sur l'expression des gènes <i>PA-ACSI</i> et <i>PA-ACS2</i></u>	63

<b>I - 3 - <u>Complexité des gènes PA-ACS1 et PA-ACS2 dans le génome d'abricot</u></b>	<b>64</b>
<b>II - <u>LE GENE d'ACC OXYDASE D'ABRICOT</u></b>	<b>65</b>
<b>II - 1 - <u>Expression du gène PA-ACO pendant le développement du fruit sur l'arbre</u></b>	<b>65</b>
<b>II - 2 - <u>Effet des traitements post-récolte sur l'expression du gène PA-ACO</u></b>	<b>66</b>
II - 2 - 1 - <u>Effet du CO<sub>2</sub> sur l'expression du gène PA-ACO</u>	<b>66</b>
II - 2 - 2 - <u>Effet de l'éthylène et du 1-MCP sur l'expression du gène PA-ACO</u>	<b>67</b>
<b>II - 3 - <u>Accumulation de la protéine d'ACC oxydase</u></b>	<b>68</b>
II - 3 - 1 - <u>Accumulation de la protéine ACC oxydase pendant le développement du fruit</u>	<b>68</b>
II - 3 - 2 - <u>Effet des traitements post-récolte sur l'expression de la protéine d'ACC oxydase</u>	<b>69</b>
<b>II - 4 - <u>Complexité du gène PA-ACO dans le génome d'abricot Bergeron</u></b>	<b>70</b>
<b>III - <u>LE GENE p69RF D'ABRICOT</u></b>	<b>70</b>
<b>III - 1 - <u>Expression du gène p69RF pendant le développement du fruit</u></b>	<b>71</b>
<b>III - 2 - <u>Effet des traitements post-récolte du fruit sur l'expression du gène p69RF</u></b>	<b>71</b>
III - 2 - 1 - <u>Effet de l'éthylène et du 1-MCP sur l'expression du gène p69RF d'abricot</u>	<b>72</b>
III - 2 - 2 - <u>Effet du CO<sub>2</sub> sur l'expression du gène p69RF d'abricot</u>	<b>73</b>
<b>III - 3 - <u>Complexité du gène p69RF dans le génome d'abricot Bergeron</u></b>	<b>73</b>
<b><u>Caractérisation des gènes impliqués dans d'autres métabolismes</u></b>	<b>75-78</b>
<b>I - <u>LES GENES IMPLIQUES DANS LA PERTE DE FERMETE</u></b>	<b>75</b>
<b>I - 1 - <u>Présentation</u></b>	<b>75</b>
<b>II - <u>CARACTERISATION D'AUTRES GENES ISOLES DU FRUIT</u></b>	<b>77</b>
<b>II - 1 - <u>Présentation</u></b>	<b>77</b>

<b><i>Discussion générale, perspectives et intérêts du travail</i></b>	<b>79-86</b>
<b><i>Références bibliographiques</i></b>	<b>87-107</b>
<b><i>Annexes</i></b>	<b>108-158</b>

## ABREVIATIONS

ACC : Acide-1-amino cyclopropane carboxylique

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

BET : Bromure d'éthidium

BLAST : Basic local alignment search tool

ddNTP : di-Désoxyribonucléotide triphosphate

DDRT-PCR : Differential display reverse transcription-polymerase chain reaction

dNTP : Désoxyribonucléotide triphosphate

$\beta$ -GAL :  $\beta$ -galactosidase

X-GAL : 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside

IPTG: Isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside

JAA : Jours après anthèse

1-MCP : 1-Méthylcyclopropène

PME : Pectineméthylestérase

RT-PCR : « Reverse-Transcriptase Polymerase-Chain-Reaction »

RACE-PCR: Rapid amplification of cDNA ends-polymerase chain reaction

SAM : S-adenosylméthionine

# ***Avant-propos***

## **AVANT-PROPOS**

Il existe un lien évident entre la physiologie de la maturation des fruits et leurs qualités organoleptiques et nutritionnelles. En effet, ces dernières sont influencées par de nombreuses modifications biochimiques qui surviennent plus particulièrement pendant la maturation du fruit.

La maturation de l'abricot est de type climactérique. L'étude du processus de maturation chez d'autres fruits comme la tomate et la pomme a montré qu'il s'agit d'un phénomène complexe mettant en jeu de nombreuses modifications physico-chimiques telles que le dégagement gazeux (éthylène et CO<sub>2</sub>), le changement de couleur, la fermeté, la saveur ou encore l'arôme qui, au final, influencent ses qualités organoleptiques. L'évolution de ces différents paramètres reflète les modifications biochimiques et des expressions géniques associées au processus de maturation. Nombre des aspects de la maturation sont aujourd'hui connus pour être régulés par l'éthylène au niveau moléculaire.

Dans le vaste programme d'amélioration de la qualité organoleptique de l'abricot, la station de Technologie des Produits Végétaux a mis en place une approche d'amélioration assistée par les marqueurs moléculaires, qui prend mieux en compte le processus de maturation du fruit. Dans le cadre de ma thèse, je me suis attaché à rechercher ces marqueurs, en particulier ceux impliqués dans la biosynthèse de l'éthylène pour son rôle clé dans le processus de maturation, la perte de fermeté et autres métabolismes secondaires (synthèse de pigments, brunissement). L'importance économique de la perte de fermeté du fruit est une évidence. En effet, c'est un des critères de choix sur lequel se base généralement le consommateur pour évaluer la qualité du fruit lors de l'acte d'achat. Pour le producteur, la fermeté du fruit est souvent utilisée pour déterminer les dates de récoltes commerciales. De plus, la sensibilité du fruit aux agents pathogènes dépend en partie de son degré de fermeté. De ce fait, la fermeté détermine la durée et les conditions de stockage des fruits avant leur mise sur le marché.

Pour cette étude, deux variétés d'abricot, Bergeron et Moniqui, ont été choisies et caractérisées en étroite collaboration avec la station de Génétique et d'Amélioration des Fruits et Légumes, et l'équipe de Mesures Physico-Chimiques dirigée par Barbara GOUBLE. Ces deux variétés sont contrastées du point de vue de la vitesse de maturation. Bergeron évolue lentement et produit peu d'éthylène, à l'inverse de Moniqui dont l'évolution rapide est associée à un fort dégagement d'éthylène. Ces deux variétés sont, de ce fait, apparues comme des modèles de choix pour cette étude.

J'ai recherché les gènes exprimés dans le fruit et codant pour les protéines impliquées dans les aspects de la maturation précédemment cités (extraction d'acides nucléiques, RT-PCR, RACE-PCR, clonage, construction et criblage de banque d'ADNc). Une fois isolés, j'ai caractérisé ces gènes par rapport au processus de maturation et à l'éthylène. Pour ce faire, j'ai étudié leur expression pendant le développement du fruit sur l'arbre et après récolte sous l'influence des traitements gazeux à l'éthylène, au CO<sub>2</sub> et au 1-méthylcyclopropène, ses inhibiteurs (northern et western blot).

Au terme de cette étude, les principaux résultats suivants ont été obtenus :

\* Quarante cinq gènes d'abricot ont été isolés du fruit d'abricot et enregistrés dans la banque de données Genbank,

\* Certains de ces gènes codent pour les protéines impliquées dans la voie de biosynthèse de l'éthylène (5 gènes), pour les protéines impliquées dans la perte de fermeté (4 gènes), et pour les métabolismes secondaires (2 gènes). Ils ont plus ou moins été caractérisés.

\* Les gènes *PA-ACS2* et *PA-ACO* ont pour l'instant été validés comme des marqueurs moléculaires de la maturation. Ils codent respectivement pour l'ACC synthase et l'ACC oxydase, deux enzymes clé de la voie de biosynthèse de l'éthylène.

\* Le processus moléculaire de la biosynthèse de l'éthylène pendant la maturation de l'abricot est similaire à celui observé chez la tomate.

La portée de ce travail se situe aussi bien sur le plan scientifique qu'économique.

Dans le premier cas, l'identification et la caractérisation d'un modèle d'étude du processus de maturation des fruits à noyau faisait actuellement défaut. Les différents gènes isolés ainsi que leur caractérisation actuelle et future permettront de développer une expertise dans le domaine de la maturation de l'abricot, dont sont demandeuses d'autres équipes internationales ; italienne, en particulier. Cette dernière, qui travaille actuellement sur la perte de fermeté du fruit liée à la maturation de la pêche et de l'abricot, a contacté l'INRA-STPV pour développer des coopérations dans le cadre de cette approche. Enfin, ces gènes sont des outils dont pourront se servir les différents acteurs de la filière fruit, comme les généticiens de l'abricot dans le suivi de l'hérédité des paramètres de qualité ou les agronomes dans la précision du rôle des facteurs pédoclimatiques et des pratiques culturales (éclaircissage, charge etc.) sur l'évolution des paramètres de la qualité.

Sur le plan économique, les marqueurs validés dans cette étude et celle à venir permettront de maîtriser la qualité organoleptique des abricots mis sur le marché.



En effet, chez le fruit en maturité sur l'arbre, le suivi de l'évolution de ces marqueurs permettra de déterminer objectivement les dates de récoltes commerciales, et par conséquent d'optimiser les conditions de transport et de conservation des fruits avant leur mise sur le marché.

# ***Etude bibliographique***

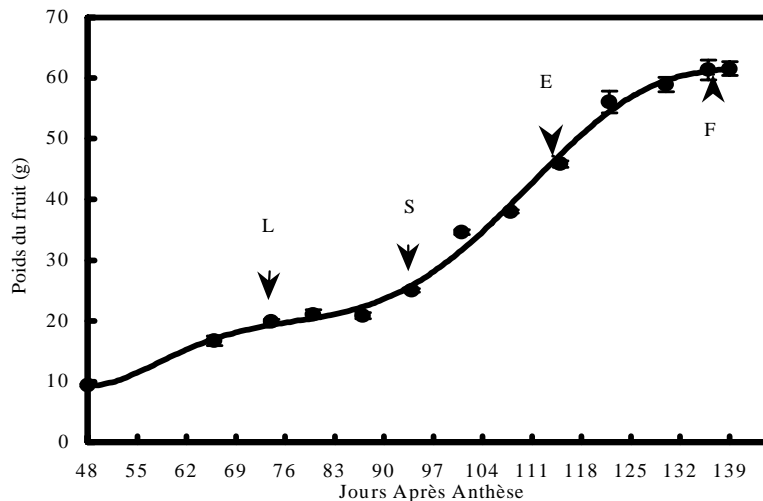
## **I - L'ABRICOT**

### **I - 1 - L'anatomie du fruit**

D'un point de vue botanique, l'abricot est une drupe, c'est à dire un fruit charnu dont la graine (ou amande) est enfermée dans un noyau lignifié et très dur. Il provient du développement, après fécondation, d'un ovaire simple à une seule loge, dont la paroi se diversifie en trois structures tissulaires bien distinctes : l'épiderme (peau), le mésocarpe (chair) et l'endocarpe lignifié (noyau) (Fig. 1). L'épiderme est recouvert d'un enduit cireux, la cuticule, garnie chez la plupart des variétés d'une couche superficielle de poils très fins. Le mésocarpe est un parenchyme mou à maturité, dont le système vasculaire très développé est associé à des fibres de couleur blanchâtre nettement perceptibles chez le fruit mûr. Le nombre, l'épaisseur et la disposition de ces fibres diffèrent depuis la périphérie vers le centre du fruit. Chez la grande majorité des variétés, le noyau ou endocarpe est libre, ou faiblement adhérent. A maturité, il est très nettement séparé de la chair par un espace plus ou moins important. Sa surface est lisse. Les différentes variétés d'abricot ont des formes et des tailles très variables. Assez symétrique, l'abricot est constitué de deux oreillons séparés par une suture radiale plus ou moins profonde. Cette dernière s'étend sur la moitié du fruit, entre l'attache pédonculaire et l'apex. En fonction de la forme et de l'épaisseur des oreillons, la morphologie du fruit peut être arrondie ou oblongue. Le poids moyen à maturité varie de moins de 40 g (Rouge du Roussillon) à plus de 90 g (Goldrich, Hargrand). La couleur de fond de l'épiderme peut être blanc crème (Moniqui), orange clair (Canino, Béliana, Polonais), orange (Bergeron), ou d'un orange très intense (Goldrich).



**Figure 1 :** Photos des variétés d'abricot Bergeron (A) et Moniqui (B) utilisées dans nos travaux .



**Figure 2 :** Courbe de croissance du fruit d'abricot (variété Bergeron) sur l'arbre.

L : début de lignification du noyau ; S : début d'accumulation du saccharose ; E : début d'émission autocatalytique d'éthylène et de la maturation du fruit F : Fruit physiologiquement mûr.

## **I - 2 - Composition et caractéristiques nutritionnelles du fruit d'abricot**

A maturité, l'abricot est un fruit dont la chair contient 84 à 88 % d'eau. Les principaux constituants du suc vacuolaire sont des sucres et deux acides organiques. Le saccharose est la forme principale de transport des assimilats de la photosynthèse et l'activité invertase est très faible. A maturité, le saccharose (60 à 70 g.kg<sup>-1</sup>) représente près de 80 % des sucres totaux. On retrouve en quantité plus limitée du glucose (~20 g.kg<sup>-1</sup>) et du fructose (moins de 10 g.kg<sup>-1</sup>). Le malate et le citrate sont les deux principaux anions organiques présents chez l'abricot. Ils proviennent essentiellement du métabolisme des sucres du fruit. Les teneurs finales peuvent varier de moins de 10 à plus de 40 meq/100 g de matière fraîche et le rapport malate / citrate de 0,2 à 6. Une analyse détaillée révèle également la présence de faibles quantités d'acide quinique (1 meq / 100g de matière fraîche) et de traces d'acide shikimique.

Exceptée la variété Monique, l'abricot est riche en carotènes ( $\beta$  et  $\gamma$  carotène), ce qui lui confère une très bonne activité provitaminique A. Le fruit renferme également des composés phénoliques, substrats des réactions de brunissement enzymatique. Certains de ces composés (les procyanidines) ont cependant un caractère antioxydant et sont crédités, en nutrition préventive, d'un intérêt analogue à celui des caroténoïdes. De part ses teneurs en vitamines, y compris celles en vitamine C (environ 7 mg pour 100 g de poids frais), la

consommation de 100 g d'abricot correspond à une couverture marginale des besoins quotidiens.

### **I - 3 - Les étapes du développement du fruit**

#### **I - 3 - 1 - La croissance**

Après nouaison, l'accroissement de la taille de l'abricot suit une courbe très caractéristique dite « double sigmoïde » qui se compose de trois phases principales (Fig. 2).

☼ La première phase (environ 21 à 42 jours) correspond, d'une part, au développement de l'embryon et au stockage de réserves dans l'amande et, d'autre part, à une multiplication puis une expansion de cellules de la paroi ovarienne. L'étape de divisions cellulaires est relativement courte (7 à 14 jours), et peu d'études lui ont été consacrées. Cependant, par analogie avec la pêche, il est légitime de penser que les variétés à gros fruits se caractérisent par un nombre plus élevé de cellules. A la fin de cette première phase, l'embryon et l'amande ont pratiquement atteint leur taille définitive.

☼ La seconde phase (42 jours) correspond principalement à la lignification et au durcissement du noyau. Le fruit grossit très peu et renferme essentiellement des acides organiques et un peu de glucose. L'embryon est bloqué au stade « pro-embryon ».

☼ La troisième phase (14 à 21 jours) est caractérisée par un accroissement très rapide de la taille et du poids, lié au grandissement cellulaire. Une entrée massive d'eau et d'assimilats de la photosynthèse se produit. Les fruits s'enrichissent en saccharose. La maturation est un des événements essentiels de cette troisième phase de croissance.

#### **I - 3 - 2 - La maturation**

⇒ Les fruits climactériques (F.C.) et les fruits non climactériques (F.N.C.)

On distingue deux catégories de fruits : les fruits climactériques (F.C.) et les fruits non climactériques (F.N.C.). Les F.C. (pomme, banane, tomate, etc...) présentent une forte activité respiratoire et un dégagement autocatalytique d'éthylène liés à la maturation. Chez les F.N.C. (fraise, cerise, agrumes, etc...), ces activités respiratoires ne caractérisent pas le processus de maturation (Yang et Hoffman, 1984). Chez les F. C., la

production d'éthylène est faible dans les premières phases de leur développement. Elle augmente dès que le fruit acquiert une aptitude à mûrir, et se poursuit après le détachement du fruit de la plante mère.

⇒ La maturation de l'abricot

La maturation du fruit recouvre près des 2/3 de sa phase finale de croissance. De type climactérique, la maturation de l'abricot s'accompagne d'une production autocatalytique d'éthylène. Sans qu'il y ait une stricte proportionnalité, la vitesse d'évolution sur l'arbre ou après récolte est liée à l'intensité de l'émission d'éthylène. Cette dernière dépasse rarement 5  $\mu\text{l.kg}^{-1}$  de M.F.h<sup>-1</sup> chez Bergeron et Goldrich, et elle est 30 à 50 fois plus élevée chez Monique. Cette dernière, faible chez le fruit immature, ne peut être stimulée après récolte. Le fruit acquiert l'aptitude à mûrir assez tardivement 100 à 110 jours après anthèse (JAA) suivant les variétés et les conditions pédoclimatiques. Dès lors, le fruit peut se développer, spontanément, ou après exposition à l'éthylène. A un stade plus avancé, la production autocatalytique d'éthylène se déclenche, et le fruit évolue alors rapidement, et de manière irréversible, vers la maturation, puis la sénescence.

## **II - QUELQUES DONNEES PHYSICO-CHIMIQUES SUR LA MATURATION DE L'ABRICOT SUR L'ARBRE ET EN POST-RECOLTE**

Nous ne donnerons ici que les informations relatives aux évènements physico-chimiques et biochimiques associés aux métabolismes auxquels nous nous sommes intéressés dans cette étude, à savoir, le dégagement éthylénique, le changement de couleur et la perte de fermeté. L'ensemble de ces données a fait l'objet de la thèse de Mlle Chahine Hala (1999).

### **II - 1 - Evolution de Bergeron sur l'arbre et après les traitements post-récolte**

#### **II - 1 - 1 - Maturation de Bergeron sur l'arbre**

Le fruit récolté à 89 jours après anthèse (JAA) reste ferme (valeur F max = 125 Newtons [N]) et ne dégage aucune trace d'éthylène détectable (Fig. 3A). A 110 JAA, les premières traces d'éthylène sont détectées en corrélation positive avec le ramollissement significatif du fruit dont la fermeté chute de 20 %. L'initiation de la maturation du fruit se caractérise par une émission d'éthylène de l'ordre de 10 nmoles.kg<sup>-1</sup> de matière fraîche

(MF).h<sup>-1</sup>. Ce taux augmente progressivement, et atteint un maximum à 127 JAA, correspondant également au ramollissement maximal du fruit (valeur F max = 9 N).

### II - 1 - 2 - Effet du CO<sub>2</sub> sur la maturation de Bergeron

Le traitement des fruits Bergeron au CO<sub>2</sub> à 10°C exerce un effet inhibiteur sur l'émission d'éthylène (Fig. 3B). Cet effet est corrélé à une augmentation de la fermeté du fruit (Fig. 3C). Jusqu'à 110 JAA, aucune trace d'éthylène n'est détectée, aussi bien pour les fruits maintenus à l'air que pour les fruits traités au CO<sub>2</sub>. Dans le même laps de temps, une diminution significative (13 à 52 %) de la fermeté du fruit est observée. Pour les fruits récoltés entre le 117<sup>ème</sup> et le 127<sup>ème</sup> JAA, ce traitement induit une réduction de 37 à 55 % de l'éthylène émis, comparativement aux fruits maintenus à l'air.

## II - 2 - Evolution de Moniqui sur l'arbre et après les traitements post-récolte

### II - 2 - 1 - Maturation de Moniqui sur l'arbre

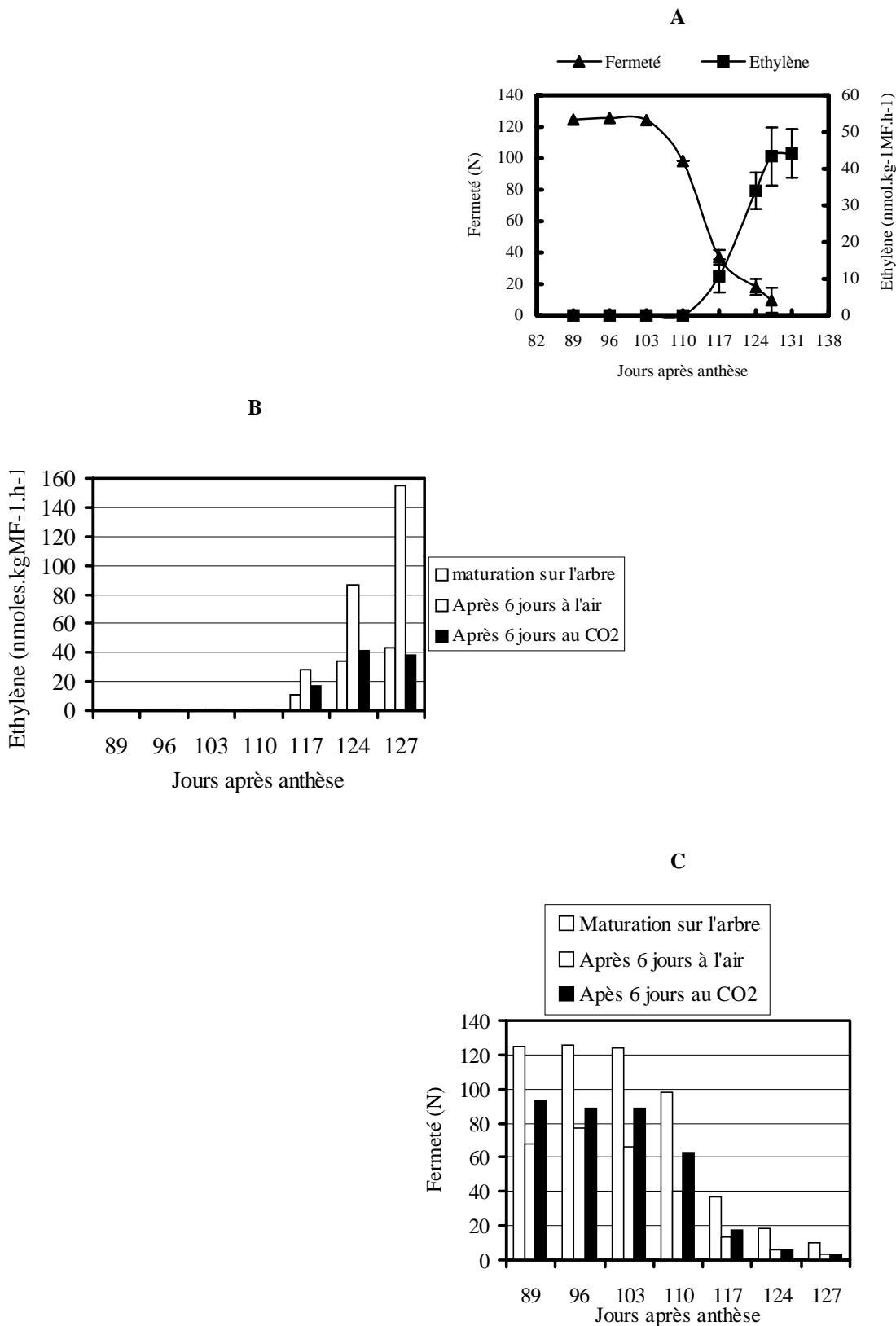
Aucune trace d'éthylène n'est détectée à 89 JAA où la valeur de l'angle de teinte (H°) est de l'ordre de 115 (Fig. 4A). Pendant la maturation du fruit Moniqui sur l'arbre, aucune trace d'éthylène n'est détectée chez le fruit jusqu'à 103 JAA. Par contre, un changement de couleur significatif est observé chez le fruit récolté dès le 99<sup>ème</sup> JAA où la valeur de H° diminue d'environ 7 %. A 106 JAA, la détection des premières traces d'éthylène (11 nmoles.kg<sup>-1</sup> de MF.h<sup>-1</sup>) est corrélée à une diminution d'environ 13 % de la valeur H°. Par la suite, l'émission d'éthylène augmente brusquement pour atteindre un maximum 110 JAA. Cette augmentation est corrélée à la variation maximale de la couleur du fruit (valeur H° = 92).

### II - 2 - 2 - Effet de l'éthylène et du 1-MCP (1-méthylcyclopropène) sur la maturation de Moniqui

L'apport d'éthylène exogène aux fruits récoltés à 89, 97, 99 et 103 JAA stimule la production d'éthylène dès le 97<sup>ème</sup> JAA (Fig. 4B). Chez les fruits maintenus à l'air, l'émission d'éthylène n'est constatée qu'à partir du 103<sup>ème</sup> JAA. Elle est d'autant plus importante que la récolte est tardive.

Le 1-MCP inhibe complètement la production d'éthylène chez tous les fruits, à l'exception de ceux récoltés 103 JAA, qui émettent de très faibles quantités (44 nmoles.kg<sup>-1</sup>

de  $\text{MF}\cdot\text{h}^{-1}$ ). Pour tous les traitements (air, éthylène, 1-MCP), la couleur évolue de façon concomitante à l'émission d'éthylène. L'évolution de la coloration est accélérée par l'éthylène, et ralentie par le 1-MCP.



**Figure 3 :** Emission d'éthylène et perte de fermeté chez le fruit d'abricot Bergeron pendant la maturation sur l'arbre (A) et après des traitements post-récoltes (B et C).

Chaque mesure d'éthylène et de la perte de fermeté pendant la maturation du fruit sur l'arbre (A) représente une moyenne calculée à partir des mesures individuelles effectuées sur 30 fruits. Il en est de même pour la mesure de fermeté des fruits après le traitement au CO<sub>2</sub>, excepté qu'ici, les mesures individuelles sont faites sur 6 à 25 fruits suivants les stades. Les écarts types calculés à partir des différentes mesures sont représentés par des barres verticales.

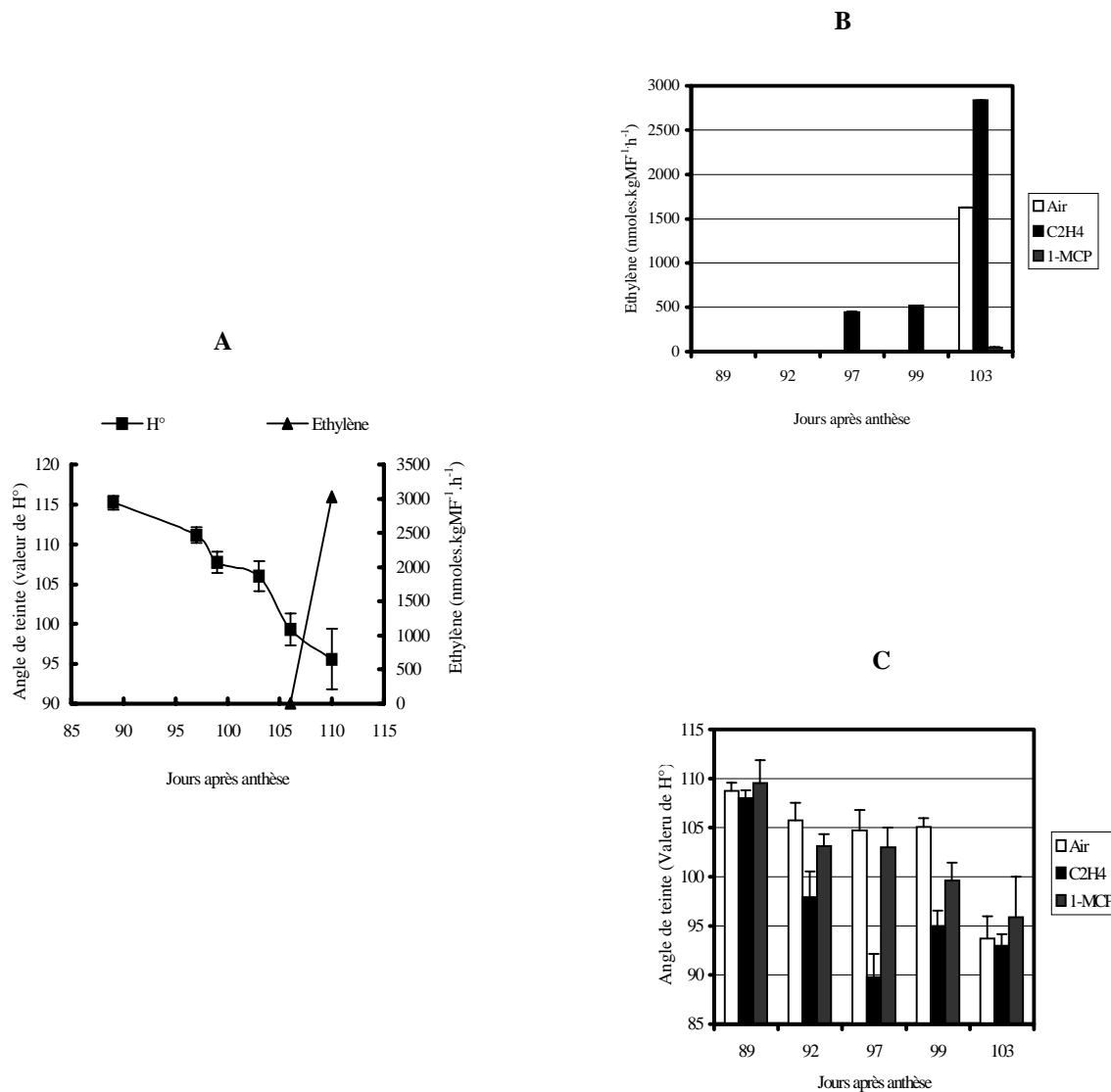


Le comportement des variétés Bergeron et Moniqui sur l'arbre et après traitements post-récolte confirme que ces deux variétés présentent une maturation de type climactérique. Leur processus de maturation est caractérisé par une émission autocatalytique d'éthylène qui induit de nombreuses modifications physico-chimiques dont sa propre synthèse, le changement de couleur, et la perte de fermeté. Chez les fruits climactériques, la vitesse de maturation est généralement associée au taux d'éthylène émis. La variété Moniqui, qui produit plus d'éthylène, mûrit plus rapidement (21 jours) que Bergeron (42 jours) qui en produit nettement moins. Le CO<sub>2</sub> ralentit le développement de Bergeron après récolte, de concert avec une baisse du taux d'éthylène émis. Ce résultat confirme ceux obtenus chez les variétés d'abricot « Moorpark » et « Large Early Montgamet » par Wankier *et al.* (1970) et d'autres fruits climactériques tels la tomate, où les conditions similaires de traitement induisent, en plus d'une baisse d'éthylène et d'un ralentissement du développement, une baisse du taux d'acides organiques, des activités des enzymes glycolitiques ainsi qu'une modification du pH cytosolique (Wang, 1990; Del Cura *et al.*, 1996 ; Rothan *et al.*, 1997).

Chez l'abricot, le changement de couleur est essentiellement dû à la dégradation des chlorophylles puis à l'accumulation des  $\beta$ -carotènes. L'évolution plus lente de la couleur chez les fruits verts traités au 1-MCP est vraisemblablement due à une inhibition partielle de l'activité de la chlorophyllase et/ou de l'expression de son gène. La néosynthèse des pigments, un des aspects majeurs responsable du changement de couleur, peut être dépendante ou indépendante de l'éthylène selon la nature du pigment et l'espèce végétale (Murray *et al.*, 1993 ; Guis *et al.*, 1997 ; Ketsa *et al.*, 1999c). Une hypothèse qui tend à se confirmer chez l'abricot. Pendant la maturation du fruit, Bergeron accumule majoritairement du  $\beta$ -carotène de couleur orangée et Moniqui du phytofluène, un précurseur incolore des carotènes. Chez Bergeron le  $\beta$ -carotène s'accumule bien avant que ne soient détectées les premières traces d'éthylène, alors que chez Moniqui l'accumulation du phytofluène et du  $\beta$ -carotène est respectivement induite et inhibée par l'éthylène (Chahine, 1999).

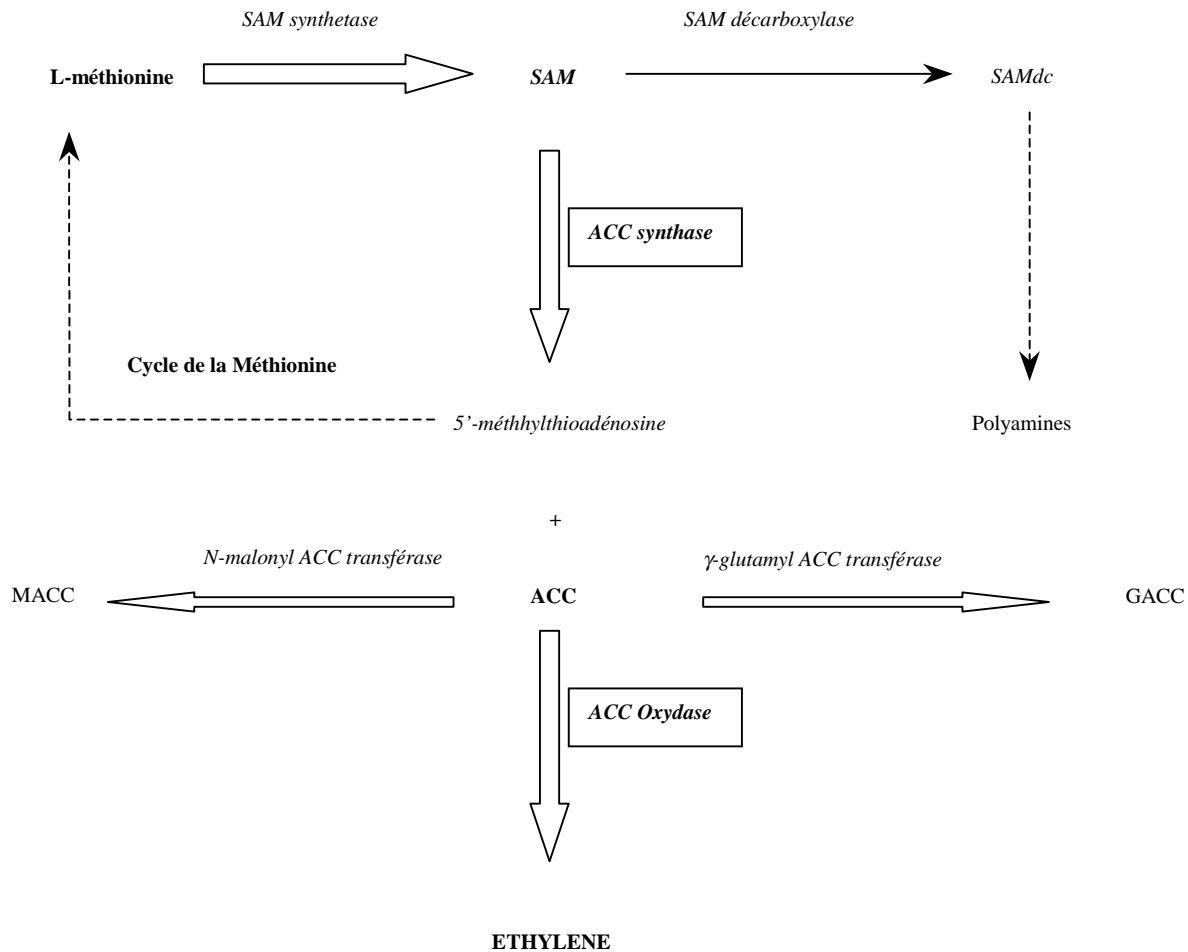
L'application, après récolte, d'éthylène et de 1-MCP sur les fruits Moniqui a permis de démontrer clairement que, pour cette variété, l'éthylène stimule, à la fois, sa propre synthèse et la maturation du fruit (Fig. 4B et 4C). En effet, les fruits récoltés 103 JAA n'émettent pas d'éthylène détectable au moment de la récolte, mais produisent une quantité significative d'éthylène (44 nmoles.kg<sup>-1</sup> de MF.h<sup>-1</sup>) après 4 jours de traitement en continu au 1-MCP. Cet éthylène ne semble pas avoir d'effet sur la couleur puisque la valeur de l'angle de teinte (H°= 95) est supérieure à celle des fruits traités à l'éthylène (H°= 92) ou à l'air (H°= 93). Ce résultat, qui semble confirmer le caractère indépendant de l'éthylène du changement de couleur lié à la maturation, soulève cependant des interrogations sur l'origine de l'éthylène

émis chez les fruits traités au 1-MCP. Cet éthylène peut résulter : i) d'un rétrocontrôle négatif de l'éthylène sur sa propre voie de biosynthèse, ii) d'un rétrocontrôle positif d'une très faible quantité d'éthylène déjà présente au moment de la récolte (cet éthylène ne serait pas détecté parce que déjà fixé aux récepteurs, ou à cause de la sensibilité trop faible de la mesure), iii) d'un stress survenu lors de la récolte ou pendant les manipulations.



**Figure 4 :** Emission d'éthylène et changement de couleur chez le fruit d'abricot Monique pendant la maturation sur l'arbre (A) et après traitement à l'éthylène ou au 1-MCP (B et C).

Chaque mesure de H° détermine l'angle de teinte et représente la moyenne des mesures faites sur 4 fruits. L'écart type calculé à partir des 4 mesures est représenté par les barres verticales. Chaque valeur d'éthylène correspond à la moyenne de deux mesures de l'éthylène émis par l'ensemble des fruits du lot traité.



**Figure 5 : Schéma de biosynthèse de l'éthylène chez les plantes supérieures et voies métaboliques associées.**

Les enzymes clé de la voie de biosynthèse, l'ACC synthase et l'ACC oxydase sont encadrées. Sont également indiquées, les voies métaboliques utilisant comme précurseurs les composés impliqués dans la biosynthèse de l'éthylène. SAM : S-adenosyl-L-méthionine, SAMdc : S-adenosyl-L-méthionine décarboxylée, ACC : 1-aminocyclopropane-1-carboxylique acid, GACC : 1-(γ-L-glutamylamino)cyclopropane-1-carboxylique, MACC : malonyl-1-aminocyclopropane-1-carboxylique.

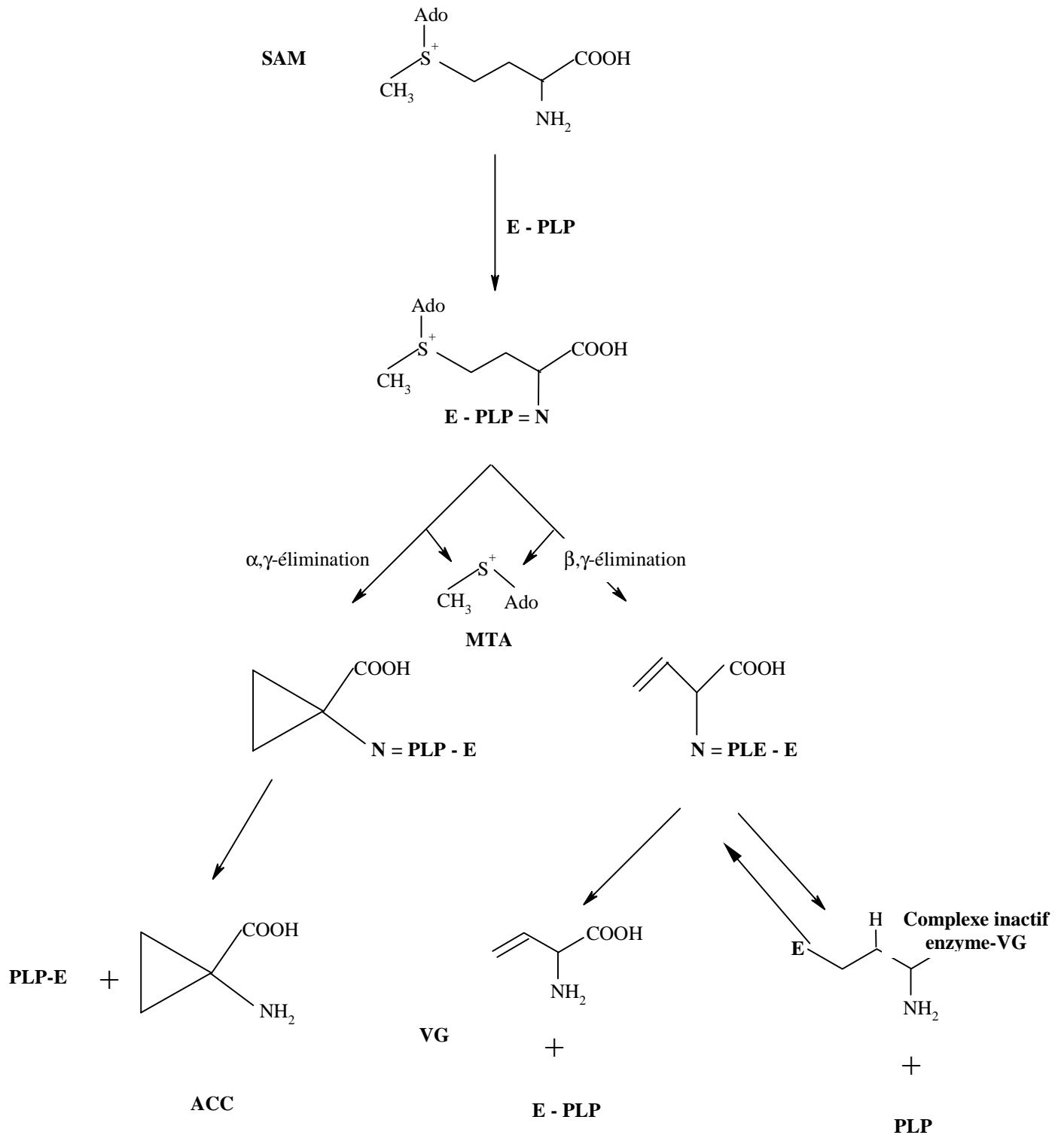
### III - LA BIOSYNTHESE DE L'ETHYLENE

L'éthylène a été mis en évidence pour la première fois par Gane (1934) chez la pomme à maturité. Depuis lors, il a été démontré que tous les tissus végétatifs et reproducteurs sont capables de synthétiser de l'éthylène (Yang et Hoffman, 1984) exception faite des tubercules d'épi d'eau (*Potamogeton pectinatus*), une monocotylédone aquatique courante des régions tempérées (Summers *et al.*, 1996). Les étapes de la biosynthèse de l'éthylène sont aujourd'hui élucidées. Elles correspondent à la chaîne métabolique présentée sur la Fig. 5 (Yang et Hoffman, 1984).

L'éthylène peut être obtenu à partir de plusieurs composés (méthionine, acide linoléique,  $\beta$ -alanine, acide acrylique, éthane, éthanol, etc.) et selon plusieurs mécanismes réactionnels; ce qui a rendu difficile la mise en évidence de son précurseur biologique. Il est aujourd'hui admis que la méthionine est le précurseur biologique majeur de l'éthylène chez les plantes supérieures. Elle est convertie en S-adénosylméthionine (SAM) par incorporation d'ATP (Yang et Hoffman, 1984). La SAM est, à son tour, transformée en acide 1-amino cyclopropane carboxylique (ACC), précurseur immédiat de l'éthylène. La conversion de l'ACC en éthylène se fait selon une stœchiométrie mole pour mole, avec libération de gaz carbonique et de cyanure. Le mécanisme mis en jeu serait une réaction d'oxydation par étapes avec libération des radicaux libres comme intermédiaires réactionnels (Acosta *et al.*, 1993). S'il est généralement admis que l'ACC est le précurseur immédiat de l'éthylène chez les plantes supérieures, il peut cependant arriver que, dans des conditions sévères de stress, l'éthylène soit synthétisé à partir d'une voie indépendante de l'ACC, à partir d'autres composés comme les lipides (Dean et Mattoo, 1991 ; Ievinsh et Tillberg, 1995).

L'ACC synthase et l'ACC oxydase sont les enzymes clés de la voie de biosynthèse de l'éthylène chez les plantes supérieures. Ces deux enzymes catalysent respectivement la formation de l'ACC à partir de la SAM, et la conversion de l'ACC en éthylène. Il est aujourd'hui admis que la conversion de la SAM en ACC constitue l'étape limitante de la biosynthèse de l'éthylène (Yang et Hoffman, 1984). Cependant, quelques études ont rapporté une augmentation de l'activité ACC oxydase en réponse à des stimulations exogènes et endogènes également connues pour induire la synthèse d'éthylène ; indiquant ainsi le rôle clé de cette enzyme (Kende, 1993 ; Vriezen *et al.*, 1999).

En étudiant l'effet du propylène exogène (possédant des propriétés analogues à celles de l'éthylène) au cours du développement du fruit, McMurchie *et al.*, (1972) ont introduit le concept de systèmes I et II pour expliquer le processus d'émission d'éthylène au cours de la maturation des F. C. Le système I est responsable de la faible émission d'éthylène présente chez les fruits préclimactériques, les tissus végétatifs et les F.N.C. (Oetiker et Yang, 1995). Le système II, spécifique des F. C. aptes à mûrir, est à l'origine de la crise éthylénique autocatalytique par rétroaction positive de l'éthylène sur les gènes d'ACC synthase et oxydase dont les activités se trouvent ainsi augmentées. A l'heure actuelle, et suite aux progrès scientifiques réalisés dans la biologie moléculaire de la biosynthèse de l'éthylène, on estime que la différence d'émission éthylénique résulterait plus d'une expression différentielle des gènes d'ACC synthase et d'ACC oxydase que d'une mise en place séquentielle des systèmes I et II.



**Figure 6 :** Réaction de  $\alpha,\gamma$ -élimination et  $\beta,\gamma$ -élimination catalysée par l'ACC synthase (E).

SAM : S-Adénosyl-L-Méthionine ; E - PLP : enzyme ACC synthase (E) liée à son cofacteur le pyridoxal phosphate (PLP) ; MTA : Méthylthioadénosine  
ACC : Acide 1-Aminocyclopropane-1-carboxylique; VG: L-vinylglycine.

### III - 1 - L'ACC synthase (EC 4.4.1.14)

L'ACC, précurseur immédiat de l'éthylène, est synthétisé à partir de la SAM par l'ACC synthase. L'ACC synthase a été identifiée et partiellement purifiée dans les tissus de tomate (Boller *et al.*, 1979) peu de temps après la mise en évidence de l'ACC. Elle a ensuite été purifiée et caractérisée chez plusieurs autres tissus végétaux (Kende, 1993 ; Yang et Dong, 1993 ; Zarembinski et Théologis, 1994). L'enzyme, soluble, est très peu abondante dans les tissus végétaux. A l'heure actuelle, les avis divergent quant à la nature monomérique ou dimérique de la protéine active (Bleecker *et al.*, 1986 ; Nakajima et Imaseki 1986 ; Sato *et al.*, 1991 ; Satoh *et al.*, 1993 ; Li et Mattoo 1994 ; Tarun et Theologis, 1998). Les deux formes coexisteraient dans la cellule. D'après Li et Mattoo (1994), l'enzyme native est un dimère ( $V_{max}/K_m = 4,362$ ) qui deviendrait super-active sous une forme monomérique, après clivage de la portion C-terminale impliquée dans la dimérisation ( $V_{max}/K_m = 20,954$ ). C'est ce clivage, post-traductionnel, qui expliquerait l'écart de 8-9 kDa constaté entre le poids moléculaire de la protéine native isolée à partir de l'extrait végétal (47 kDa) et le produit de traduction *in vitro* (56 kDa) (Nakajima *et al.*, 1988 ; Edelman et Kende, 1990). L'existence de plusieurs isoformes d'ACC synthase a été envisagée lorsque Nakagawa *et al.* (1988) ont montré que les anticorps anti-ACC synthase de blessure ne réagissaient pas contre l'ACC synthase induite par l'auxine. Cependant, leur mise en évidence par des techniques de biochimie pure a pour l'instant donné des résultats controversés (Privalle et Graham, 1987 ; Mehta *et al.*, 1988 ; Van der Straeten, 1989 ; White et Kende, 1990).

L'ACC synthase est une enzyme à pyridoxal phosphate (Yang et Hoffman, 1984). Elle catalyse deux types de réactions (Fig. 6) : la conversion de la SAM en ACC via une  $\alpha,\gamma$ -élimination, mais également la formation de la vinylglycine par  $\beta,\gamma$ -élimination (Satoh et Yang, 1989) dans la proportion de 30.000 pour 1 (Kende, 1993). La vinylglycine peut se lier de façon covalente au site actif de l'enzyme, l'inhibant ainsi de façon irréversible (Satoh et Yang, 1989). Utilisant cette propriété, Yip *et al.* (1990) ont identifié le site actif de l'ACC synthase par marquage, digestion partielle et HPLC. Il correspond au peptide SLSKDLGPGFR ; la séquence SLSK étant consensus de toutes les enzymes à pyridoxal phosphate.

Au niveau moléculaire, plusieurs ADNc complets codant pour l'ACC synthase ont été clonés chez de nombreux fruits et autres tissus (Kende, 1993 ; Yang et Dong, 1993 ; Zarembinski et Theologis, 1994). Les séquences protéiques correspondant aux différents gènes d'ACC synthase, plus conservées en N-terminal qu'en C-terminal, ont une homologie

et une similarité de séquences comprises respectivement entre 53-67 % et 72-81 %. Il est aujourd'hui admis que l'ACC synthase est codée par une famille multigénique dont les membres sont différemment régulés par les facteurs environnementaux, hormonaux et chimiques. A l'heure actuelle, au moins 6 gènes d'ACC synthase différents ont été identifiés et caractérisés chez la tomate (Rottmann *et al.*, 1991 ; Zarembinski et Théologis, 1994). Tous présentent une expression différentielle, spécifique d'un tissu donné. Deux d'entre eux, *LE-ACS2* et *LE-ACS4*, s'expriment au cours de la maturation (Rottmann *et al.*, 1991).

Dans plusieurs cas de figure, il a été démontré que l'induction de l'activité ACC synthase s'accompagne d'une néo-synthèse protéique et d'une accumulation des transcripts correspondants (Rottmann *et al.*, 1991 ; Woodson *et al.*, 1992 ; Kende, 1993 ; Yang et Dong, 1993 ; Zarembinski et Theologis, 1994). Ceci suggère une régulation transcriptionnelle et traductionnelle du gène d'ACC synthase. Cependant, d'autres travaux, menés sur les cellules en culture, ont montré que l'induction de l'ACC synthase est insensible aux inhibiteurs de la transcription ; suggérant ainsi un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle (Chappell *et al.*, 1984 ; Felix *et al.*, 1991 ; Spanu *et al.*, 1994). La coexistence de ces trois mécanismes dans la régulation du gène et de l'activité ACC synthase n'est pas à exclure. A ces mécanismes de régulation génique, d'autres, propres à l'enzyme, ou post-traductionnels, peuvent également participer, à une échelle inférieure, à la régulation de l'activité ACC synthase. Il s'agit du degré de phosphorylation de l'enzyme, dont dépend sa stabilité (Spanu *et al.*, 1994), et des séquences régulatrices, N-terminale et C-terminale, dont dépendent l'activité et la conformation de l'enzyme (Li et Mattoo, 1994 ; Li *et al.*, 1996).

### **III - 2 - L'ACC oxydase (EC 1.4.3)**

Dans le schéma de biosynthèse de l'éthylène, l'ACC oxydase catalyse l'étape de conversion de l'ACC en éthylène. Contrairement à l'ACC synthase, l'étude *in vitro* de l'ACC oxydase a été beaucoup plus tardive à cause de l'instabilité de l'enzyme *in vitro*. Les premières études de l'enzyme ont été faites *in vivo* sur des fragments de tissus en présence d'ACC. Quelques caractéristiques de l'enzyme ont pu ainsi être établies comme la spécificité pour le substrat ACC avec une affinité de 100  $\mu$ M, sa température optimum (30°C), et ses co-substrats l'O<sub>2</sub> et le Fe<sup>2+</sup> (Yang et Hoffman, 1984 ; Bouzayen *et al.*, 1991). Sur le même modèle, il a été démontré que l'intégrité de la membrane est nécessaire à l'activité de l'enzyme ; d'où son inhibition par les sondes lipophiles (Triton X-100, phosphatidyl-choline) et les chocs osmotiques. Par ailleurs, la stéréospécificité de l'enzyme pour la forme (1R, 2S) de

l'AEC (acide 1-amino-2-ethylcyclopropane-1-carboxylique) comme substrat synthétique pendant la synthèse du 1-butène a également été établie (Yang et Hoffman, 1984).

Dans l'étude *in vitro* de l'ACC oxydase, l'isolement du gène a précédé la purification de l'enzyme. En recherchant le rôle de l'ADNc pTOM13 de tomate par la technique des ARN anti-sens, Hamilton *et al.* (1990) se sont aperçus que, par rapport aux fruits sauvages, l'accumulation de messagers anti-sens de pTOM13 chez les fruits transgéniques corroborait leur faible émission d'éthylène. Devant l'absence d'homologie de séquence entre pTOM13 et les gènes d'ACC synthase déjà clonés, les auteurs ont suggéré que le polypeptide pTOM13 possédait une activité ACC oxydase. Cette hypothèse a été confirmée plus tard par l'expression du gène pTOM13 chez la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) (Hamilton *et al.*, 1991) et l'oocyte de batracien (*Xenopus laevis*) (Spanu *et al.*, 1991). L'homologie de séquences entre la flavone-3-hydroxylase et la protéine correspondant à pTOM13 a permis à Ververidis et John (1991) d'utiliser les conditions d'extraction de la flavone-3-hydroxylase pour extraire, purifier, et doser l'activité ACC oxydase de melon. Dès lors, l'enzyme a été purifiée et caractérisée chez de nombreux fruits dont la poire (Vioque et Castellano, 1994), l'avocat (McGarvey et Christoffersen, 1992) et autres tissus végétaux (Kende, 1993 ; Yang et Dong, 1993 ; Zarebinski et Théologis, 1994 ; Flühr et Mattoo, 1996).

La structure primaire du polypeptide déduit des différents ADNc déjà clonés, et les caractéristiques biochimiques de l'enzyme purifiée permettent de classer l'ACC oxydase dans la grande famille des dioxygénases. Cette famille d'enzymes catalyse les réactions de double oxydation au cours desquelles un atome d'oxygène est incorporé à la fois dans le substrat et dans le co-substrat ; ce dernier étant, en général, le 2-oxaloglutarate (Prescott et John, 1996). Cependant, l'ACC oxydase a la particularité, contrairement aux autres dioxygénases, d'utiliser comme co-substrat l'ascorbate au lieu du 2-oxaloglutarate. En plus du fer, l'enzyme nécessite le CO<sub>2</sub> pour son activité (Poneleit et Dilley, 1993). Chez l'avocat, deux activités ACC oxydase ont été isolées par fractionnement au sulfate d'ammonium (McGarvey et Christoffersen, 1992). Les extraits enzymatiques purifiés chez la poire (Vioque et Castellano, 1994) et l'orange (Dupille et Zacharias, 1996) présentent, quant à eux, deux températures optimales différentes, respectivement: 28°C et 38°C, et 35°C et 45°C. Ces données ont permis de suggérer la présence de plusieurs isoformes d'ACC oxydase. Cependant, celles-ci n'ont, pour l'instant, pas encore été isolées par des techniques de biochimie pure. Il est également possible que les différentes caractéristiques observées entre les ACC oxydases soient le résultat d'un changement de conformation d'une forme unique.



Plusieurs ADNc codant pour l'ACC oxydase ont été clonés chez de nombreux fruits (Kende, 1993 ; Yang et Dong, 1993 ; Zarembinski et Theologis, 1994 ; Flühr et Mattoo, 1996) et autres tissus végétaux (Kende, 1993 ; Zarembinski et Theologis 1994). L'ACC oxydase est codée par une famille multigénique plus petite que celle codant pour l'ACC synthase. Chaque membre de cette famille est différemment induit suivant la nature du stimulus, du tissu et de son stade de développement. Trois gènes d'ACC oxydase ont été clonés chez le melon, *CM-ACO1*, *CM-ACO2* et *CM-ACO3* (Lasserre *et al.*, 1996). *CM-ACO1* est induit par le mûrissement chez le fruit, et par la blessure et un traitement à l'éthylène chez les feuilles. *CM-ACO2* est détectable à un faible taux dans les hypocotyles étiolés, alors que *CM-ACO3* ne s'exprime que chez la fleur (Lasserre *et al.*, 1996).

Si les études biochimiques et moléculaires de l'ACC oxydase sont aujourd'hui bien avancées, sa localisation sub-cellulaire reste pour l'instant un sujet à controverse. Trois sites d'activité ACC oxydase ont, pour l'instant, été identifiés, indépendamment de l'espèce et du tissu. Il s'agit des vacuoles et des vésicules membranaires (Guy et Kende, 1984 ; Porter *et al.*, 1986 ; Mitchell *et al.* 1988; Erdman *et al.*, 1989), deux sites membranaires très sensibles aux chocs osmotiques, et également du cytosol, sensible à une plasmolyse poussée (Bouzayen *et al.*, 1990 ; Rombaldi *et al.*, 1994 ; Ramassamy *et al.*, 1998).

#### **IV - LA REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DE L'ETHYLENE**

La synthèse de l'éthylène peut être induite par plusieurs facteurs développementaux (germination, croissance, maturation, sénescence) et environnementaux comme le stress (attaque fongique, blessure) ou un traitement exogène (éthylène, cytokinine, auxine). L'étude du mécanisme de régulation de la biosynthèse de l'éthylène dans ces différents cas de figure a permis de dégager deux niveaux de régulation majeurs : d'une part, le rétro-contrôle positif ou négatif exercé par l'éthylène sur les gènes de sa voie de biosynthèse (ACC oxydase et ACC synthase) et, d'autre part, la régulation de la teneur en ACC disponible.

##### **IV - 1 - Le rétrocontrôle positif de la biosynthèse de l'éthylène : la régulation des gènes d'ACC oxydase et d'ACC synthase par l'éthylène**

Le rétrocontrôle positif de la biosynthèse de l'éthylène est une des caractéristiques majeures de la maturation des fruits climactériques et de la sénescence des fleurs. De nombreuses études ont rapporté que la forte émission d'éthylène observée après le traitement

des fruits ou des fleurs par de l'éthylène exogène s'accompagne d'une activation des enzymes ACC synthase et/ou ACC oxydase (Kende, 1993 ; Yang et Dong, 1993 ; Zarembinski et Theologis, 1994 ; Flühr et Mattoo, 1996). Dans de nombreux cas de figure, la stimulation de la production d'éthylène (Penarrubia *et al.*, 1992 ; Kneissl et Deikman, 1996) ou, au contraire, son inhibition par des traitements post-récolte (Gorny et Kader, 1996 et 1997 ; Lurie *et al.*, 1996 ; Nakatsuka *et al.*, 1997, 1998 ; Ketsa *et al.*, 1999a) respectivement induisent et réduisent les activités ACC synthase et oxydase ainsi que la transcription des gènes correspondant.

#### **IV - 2 - Le rétrocontrôle négatif de la biosynthèse de l'éthylène**

##### IV - 2 - 1 - Le contrôle du niveau d'ACC cellulaire par l'éthylène

###### ⇒ L'inhibition des gènes d'ACC synthase

L'auto-inhibition de la biosynthèse de l'éthylène a été démontrée chez certains tissus de fruit et autres végétatifs (Flühr et Mattoo, 1996). On ne sait cependant que peu de choses sur les mécanismes biochimique et moléculaire de cette auto-inhibition chez les fruits. La régulation du niveau d'ACC cellulaire par l'éthylène peut se faire soit au niveau de sa synthèse via une inhibition des gènes d'ACC synthase, soit au niveau de sa dégradation en activant sa conversion en produit de fin de chaîne. L'inhibition des gènes d'ACC synthase a surtout été rapportée dans des cas de blessure (Yoshii et Imaseki, 1982 ; Nakajima *et al.*, 1990 ; Peck et Kende, 1998). Ce phénomène se produirait également pendant la maturation du fruit. En effet chez la tomate, le gène *LE-ACS6* est induit par le 1-MCP, un inhibiteur des sites récepteurs de l'éthylène (Nakatsuka *et al.*, 1998).

###### ⇒ La conversion de l'ACC disponible en produit de fin de chaîne

Un des mécanismes qui régule le taux d'ACC disponible est sa conjugaison en acide malonyl-1-aminocyclopropane-1-carboxylique (MACC) séquestré dans les vacuoles et généralement considéré comme un produit de fin de chaîne, métaboliquement inactif (Yang et Hoffman, 1984). L'ACC N-malonyl transférase, qui catalyse la réaction de conjugaison, n'a pour l'instant été caractérisée qu'au niveau biochimique. Partiellement purifiée chez les tissus végétatifs et la tomate, c'est un monomère d'environ 38 kDa (Guo *et al.*, 1992 ; Benichou *et al.*, 1995 ; Martin et Saftner, 1995 ; Chick et Leung, 1997). Chez la tomate, l'activité de l'enzyme est élevée dans le péricarpe du fruit mi-mûr, et augmente chez le fruit vert immature et mature après un traitement à l'éthylène exogène (Liu *et al.*, 1985a ; Liu *et al.*, 1985b ;

Martin et Saftner, 1995). Chez les pommes en début de phase climactérique, plus de 40 % de l'ACC synthétisé dans l'épiderme, et plus de 5 % de celui de la pulpe, sont convertis en MACC (Mansour *et al.*, 1986). De ce fait, la conversion de l'ACC en MACC contribuerait à maintenir à un niveau bas l'éthylène dans les phases préclimactériques du fruit. Par contre, dans les phases tardives, elle constituerait une voie de dégradation alternative permettant de dissiper l'ACC excédentaire non converti en éthylène.

Une autre forme conjuguée de l'ACC, l'acide 1-( $\gamma$ -L-glutamyl-amino-cyclopropane-1-carboxylique (GACC), a récemment été identifiée chez la tomate (Martin *et al.*, 1995). Cependant, cette forme conjuguée de l'ACC serait minoritaire dans le fruit (Peiser et Yang 1998). Le profil d'accumulation du GACC, son rôle dans le processus de maturation, tout comme les caractéristiques biochimique et moléculaire de l'ACC  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase, enzyme impliquée dans sa biosynthèse, restent pour l'instant inconnus.

#### IV - 2 - 2 - La protéine E8

Un autre mécanisme par lequel l'éthylène inhiberait sa propre synthèse est celui impliquant la protéine E8. Ce mécanisme n'a, pour l'instant, été démontré que chez la tomate où la fonction de la protéine E8 n'a pas encore été identifiée. Le gène E8 est induit par l'éthylène au début de la maturation de la tomate (Lincoln *et al.*, 1987). Son inhibition par la technique des ARN anti-sens, ou par co-suppression, induit, chez les individus transgéniques, une augmentation de la biosynthèse de l'éthylène corrélée à une accumulation d'ACC, de messagers d'ACC synthase et d'ACC oxydase (Penarrubia *et al.*, 1992 ; Kneissl et Deikman, 1996). La structure primaire de la protéine E8 déduite de la séquence d'ADNc indique qu'elle est homologue aux dioxygénases et aux protéines d'ACC oxydase (Prescot et John, 1996). Elle présente également des motifs impliqués dans la dimérisation (Vinson *et al.*, 1989). De ce fait, induite par l'éthylène, la protéine E8 participerait à l'auto-inhibition de la biosynthèse de l'éthylène par compétition avec l'ACC oxydase pour le substrat ACC. De même, en formant des hétérodimères E8-ACC oxydase, la protéine E8 peut réduire significativement la quantité de protéine d'ACC oxydase disponible, et favoriser ainsi l'auto-inhibition de la biosynthèse de l'éthylène.

#### IV - 3 - Autres formes de régulation de la biosynthèse de l'éthylène

Les différentes voies métaboliques qui utilisent, comme précurseurs, des composés impliqués dans la voie de biosynthèse de l'éthylène, peuvent également participer à sa régulation par effet de compétition. C'est le cas, par exemple, de la synthèse des polyamines, et de la transméthylation des lipides, d'acides nucléiques, de protéines et des polysaccharides ; voies métaboliques pour lesquelles la SAM sert également de précurseur (Tabor et Tabor, 1984). Enfin, chez les plantes, de nombreux composés (l'oxyde d'éthylène, le CO<sub>2</sub>, l'oxalate, l'éthylène glycol et ses conjugués glycosylés, etc...) proviennent d'une oxydation de l'éthylène. Notons cependant que celle-ci n'aurait, aucune influence sur le taux ou le mode d'action de l'éthylène endogène (Beyer Jr, 1987 ; Flühr et Mattoo, 1996).

## **V - LE MODE D'ACTION DE L'ETHYLENE**

### **V - 1 - Transduction du signal éthylénique**

Lorsque les jeunes pousses de plantes sont mises en culture en présence d'éthylène, elles adoptent une morphologie très particulière appelée la triple réponse (Knight *et al.*, 1910). Chez *Arabidopsis thaliana*, la triple réponse se caractérise par une exagération de la courbure apicale, une inhibition de la croissance des racines, ainsi que par l'arrêt de l'élongation et un gonflement de l'hypocotyle. C'est ce phénomène de triple réponse qui a servi de base à l'étude du mécanisme de perception et de transduction du signal éthylénique suivant trois approches : génétique, moléculaire et biochimie.

L'approche génétique a été très longuement étudiée sur le modèle *Arabidopsis thaliana*. Les différents résultats obtenus ont été rapportés dans de nombreuses revues de synthèse (Bleecker, 1991; Ecker, 1995; Bleecker et Schaller, 1996 ; Johnson et Ecker, 1998). De nombreuses mutations ont pu être identifiées et classées en deux catégories :

- celles qui confèrent une insensibilité plus ou moins prononcée à l'éthylène aux individus qui, par conséquent, ne présentent pas de triple réponse même après traitement à l'éthylène exogène. Ce sont les mutations *etr1* et *2* (éthylène récepteur), *ein2* à *7* (éthylène insensible) et *ain 1* (ACC insensible).

- celles qui confèrent aux individus une sensibilité constitutive à l'éthylène. Ce sont les mutations *ctr1* (triple réponse constitutive) et *eto1* à *3* (éthylène surproductif).

Par la suite, les techniques de double mutation et de transgression ont permis d'établir l'ordre suivant lequel agissent les produits des différents gènes dans la transduction du signal éthylénique. Les produits des gènes *eto* interviennent en premier dans la chaîne de transduction du signal. Ensuite interviennent ceux des gènes *ETR1* et *EIN4* qui agissent en

amont de celui du gène *CTR1*, alors que ceux des gènes *EIN2*, *EIN3*, *EIN5* et *EIN7* agissent en aval de *CTR1* (Fig. 7).

Les données actuelles suggèrent que la transduction du signal éthylénique se ferait par une cascade de phosphorylations, laquelle modulerait l'activité des facteurs de transcription des gènes. Le signal éthylénique est perçu par une famille composée de trois types de récepteurs, ETR1 (« éthylène récepteur »), ERS (« éthylène réponse sensible ») et EIN4 (« éthylène insensible »). Les gènes correspondant ont été clonés et caractérisés chez de nombreux fruits et autres tissus végétaux (Chang *et al.*, 1993 ; Zhou *et al.*, 1996; Vriezen *et al.*, 1997; Hua *et al.*, 1998 ; Lashbrook *et al.*, 1998a ; Tieman et Klee, 1999). Ils sont différemment régulés suivant le tissu, son état physiologique et le stimulus. Tous ces gènes codent pour des protéines de type histidine kinase proches de la famille du système à deux composés, et impliquées dans la transduction du signal chez les procaryotes. Elles comportent trois domaines très conservés : N-terminal : récepteur d'éthylène, histidine kinase et C-terminal : régulateur et porteur d'un site de phosphorylation. Ces trois domaines sont présents chez les protéines du type ETR et EIN4, alors que celles du type ERS ne possèdent que les domaines N-terminal et histidine kinase. Le domaine N-terminal est fortement homologue d'un type de récepteur à un autre. Sa capacité à fixer l'éthylène a été démontrée par mutation et expression chez la levure de celui de la protéine ETR1 (Schaller et Bleecker, 1995 ; Hall *et al.*, 1999). Cette perception du signal éthylénique modulerait les activités du domaine histidine kinase et C-terminal qui, à leur tour, réguleraient les éléments en aval du système de transduction par analogie au système bactérien. Les protéines des gènes *CTR1* et *EIN3* agissent en aval des protéines réceptrices. Elles régulent négativement l'action de l'éthylène, et s'apparentent respectivement à la protéine kinase à sérine / thréonine de type *Raf*, et à un facteur de transcription (Chao *et al.*, 1997; Johnson et Ecker 1998). La transduction du signal entre les récepteurs d'éthylène et les protéines *CTR1* et *EIN3* se ferait indirectement via un second messenger, le calcium, ou simplement par une interaction directe protéine-protéine (Berry *et al.*, 1996 ; Kim *et al.*, 1997 ; Kwak et Lee, 1997 ; Clark *et al.*, 1998).

Quant à l'approche biochimique, elle a démontré depuis très longtemps, *in vivo* et *in vitro*, l'existence chez les plantes d'un récepteur de l'éthylène de type métalloprotéique (Burg et Burg 1967 ; Sisler, 1979 ; Bengochea *et al.*, 1980). Les tentatives d'isolement d'une entité capable de fixer l'éthylène par des méthodes de biochimie pures n'ont pour l'instant pas encore définitivement abouti (Harpham *et al.*, 1996 ; Holland *et al.*, 1996 ; Hall *et al.*, 1993). Cependant, l'expression de la protéine ETR chez la levure a montré qu'elle fonctionne comme un homo dimère membranaire de 147 kDa capable de fixer l'éthylène au niveau du

domaine N-terminal de manière nano-molaire et saturante (Schaller et Bleecker, 1995). Récemment, Rodriguez *et al.* (1999) ont identifié le cuivre comme étant le métal principal cofacteur de l'activité ETR.

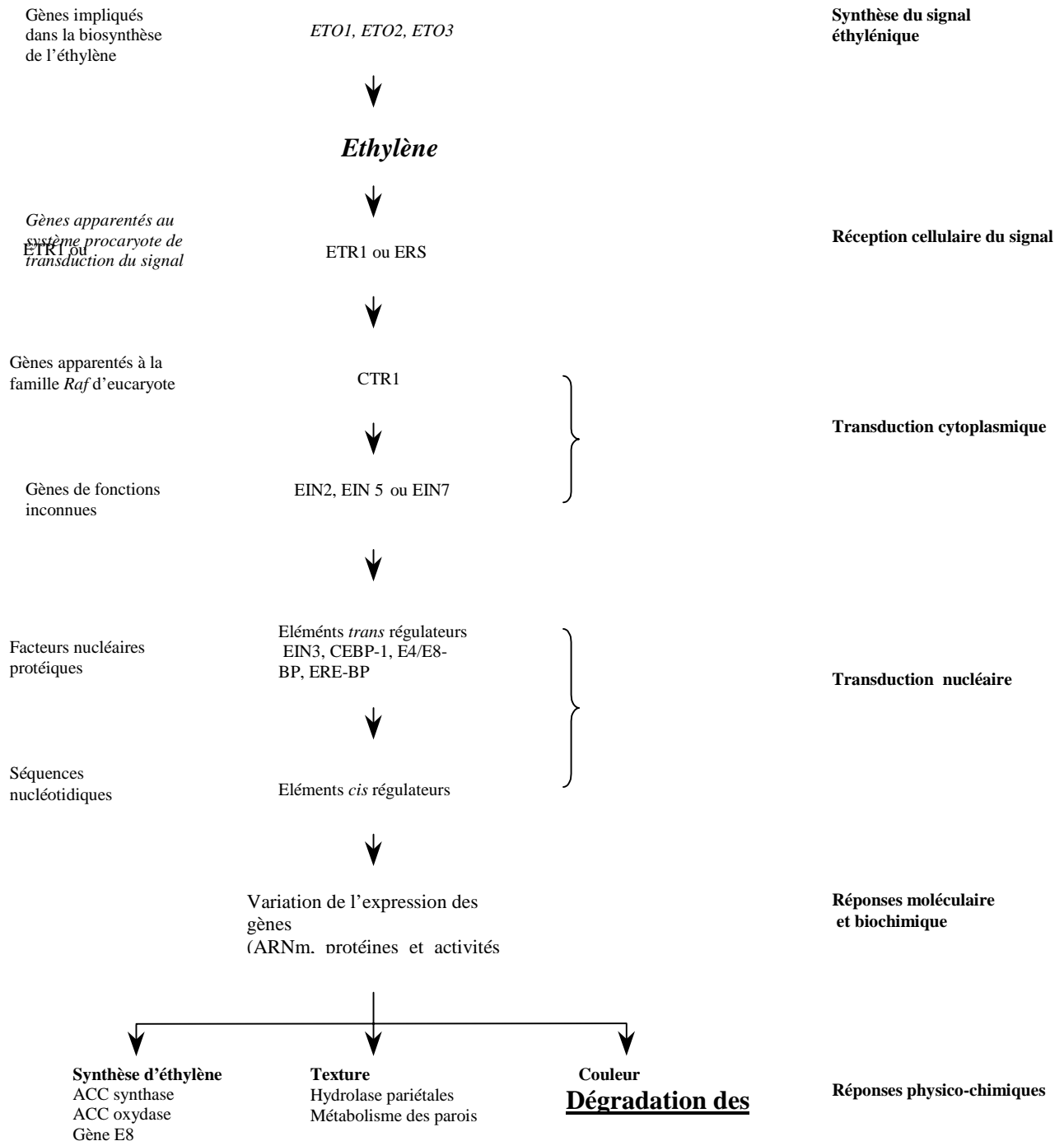


Figure 7 : Schéma de transduction du signal éthylénique (Latché *et al.*, 1995, modifié).

CTR : constitutive triple response ; CEBP : carnation ethylene binding protein ; ETR : ethylene receptor ; EIN : ethylene insensitive ; E4/E8-BP : E4/E8 binding protein ; ERE-BP : ethylene responsive element binding protein ; ERS : ethylene responsive sensor ; CEBP : carnation ethylene binding protein

## V - 2 - L'éthylène et la régulation de l'expression des gènes

L'éthylène régule génétiquement un grand nombre de processus physiologiques des végétaux. Cette régulation est spécifique du tissu et de son stade de développement. Dans trois contextes différents, des gènes spécifiquement induits ont servi de modèles pour l'étude du mécanisme de régulation des gènes par l'éthylène. Il s'agit des gènes :

- de la  $\beta$ -1,3-glucanase, gène de défense induit par l'éthylène après une attaque fongique (Felix et Meins, 1987),
- *pSR8* codant pour la glutathion-S-transférase (*GSTI*) et induit lors de la sénescence (Itzhaki *et al.*, 1994), et,
- *E4* codant pour une protéine de fonction inconnue fortement exprimée pendant la maturation de la tomate (Lincoln *et al.*, 1987).

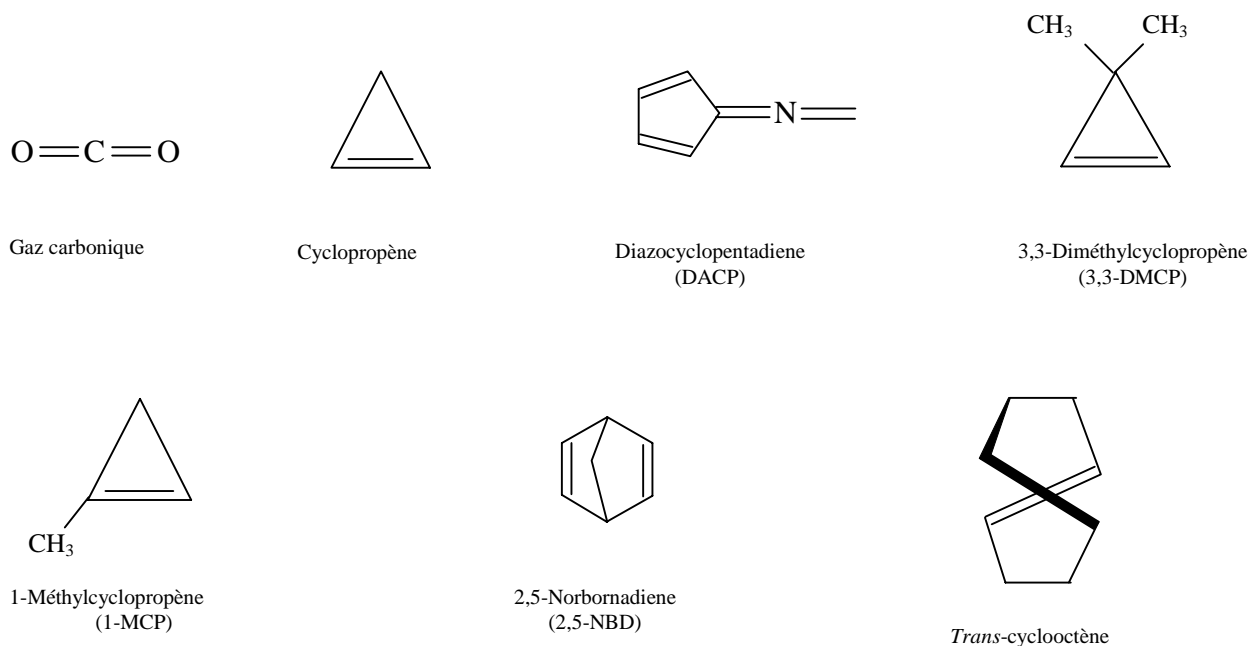
Des études menées sur ces différents modèles, il ressort que l'éthylène contrôle l'expression des gènes au niveau transcriptionnel. Les facteurs de transcription mis en jeu sont des protéines nucléaires différentes, d'un contexte à l'autre, de part leurs caractéristiques biochimiques et moléculaires. En effet, 5 facteurs de transcription différents, les EREBP (ethylene responsive element binding protein), impliqués dans la régulation de la transcription des gènes par l'éthylène émis en réponse à l'attaque d'un pathogène ont été définis, et leurs gènes clonés (Ohme-Takagi et Shinshi, 1995). Un seul a été mis en évidence pendant la sénescence et la maturation, ce sont respectivement les protéines CEBP-1 (carnation ethylene responsive element binding protein) (Maxon et Woodson, 1996) et E4/E8BP (E4/E8 binding protein) (Cordes *et al.*, 1989). Alors que les EREBPs agissent comme des facteurs activateurs de gènes, les protéines CEBP-1 et E4/E8BP seraient plutôt des répresseurs (Deikman, 1997). Les séquences nucléiques consensus des promoteurs, reconnues par les différents facteurs de transcription, sont également différentes d'un contexte à l'autre (Ohme-Takagi et Shinshi, 1995 ; Itzhaki *et al.*, 1994 ; Xu *et al.*, 1996).

## VI - LES INHIBITEURS DU MODE D'ACTION DE L'ETHYLENE

De nombreuses substances capables d'interférer dans le mode d'action de l'éthylène ont récemment été identifiées. Ces substances agissent, pour la plupart, au niveau des récepteurs éthyléniques, et se comportent, soit comme des agonistes qui miment l'action de l'éthylène, soit comme des antagonistes. Le CO<sub>2</sub>, le 2,5-norbornadiène : une oléfine cyclique, analogue structurale de l'éthylène (2,5-NBD), et l'ion Ag<sup>+</sup> sont les premiers antagonistes de l'éthylène à avoir été identifiés (Burg et Burg, 1967 ; Sisler et Pian, 1973 ;

Beyer, 1976). Leur capacité à retarder les effets de l'éthylène a été démontrée depuis très longtemps, respectivement chez le pois, le tabac et les fleurs (Burg et Burg, 1997 ; Sisler et Pian, 1973 ; Reid, 1980). Le mécanisme par lequel ces substances interfèrent, *in vivo*, dans le mode d'action de l'éthylène n'est pour l'instant pas élucidé. Le 2,5-NBD et le CO<sub>2</sub> agiraient comme des inhibiteurs compétitifs de l'éthylène cependant que le CO<sub>2</sub> a également été identifié comme un cofacteur de l'ACC oxydase (Poneleit et Dilley, 1993). Quant à l'ion Ag<sup>+</sup>, il agirait via une interaction avec les ligands impliqués dans la perception de l'éthylène ; les rendant ainsi inactifs. L'utilisation commerciale du CO<sub>2</sub> et de l'ion Ag<sup>+</sup> est très répandue pour prolonger, respectivement, la conservation des fruits en atmosphère contrôlée, et la survie des fleurs coupées. Quant au 2,5-NBD, il a surtout été utilisé en laboratoire. L'ion Ag<sup>+</sup> et le 2,5-NBD présentent plusieurs inconvénients qui limitent leur utilisation aussi bien commerciale que scientifique. Ils ont une odeur désagréable, et nécessitent une application en continu et à forte concentration pour être efficace. De plus, l'ion Ag<sup>+</sup>, en tant que métal lourd, est inutilisable chez les fruits. Dès lors, ont été recherchés et identifiés de nouveaux antagonistes de l'éthylène tels que le diazocyclopentadiène (DACP), les trans-cyclooctènes et les cyclopropènes dont le 1-méthylcyclopropène (1-MCP) et le 3,3-diméthylcyclopropène (3,3-DMCP). Dans de nombreux cas de figures, leur effet inhibiteur sur le mode d'action de l'éthylène a été étudié au niveau biochimique, et rapporté dans la littérature (Sisler et Serek, 1999). Sur la base de leurs caractéristiques résumées dans la Fig. 8, le 1-MCP, considéré comme l'inhibiteur de choix, est le plus utilisé en laboratoire.





Substances	Plante testée	Concentration seuil inhibitrice (nmol. l <sup>-1</sup> )	Avantages	Inconvénients
DACP (obscurité) DACP (lumière)	œillet œillet	700 000 140		Non commercialisé, actif et explosif à forte concentration, conservé dans des solvants organiques, nécessite une application en continu
3,3-DMCP	Banane	700	Commercialisé Très stable	Inodore, aucune toxicité révélée
1-MCP 1-MCP 1-MCP	Banane œillet Pois	0,7 0,5 40	Commercialisé Facile à synthétiser Très stable	Inodore, aucune toxicité révélée
2,5-NBD	Banane	55 000	Commercialisé	Odeur désagréable, nécessite une application en continu
<i>Trans</i> -cyclooctène	Banane	780		Non commercialisé, odeur désagréable, nécessite une application en continu et à forte concentration

**Figure 8 :** Structures de quelques inhibiteurs de l'éthylène et leurs caractéristiques.

Le DACP est instable à la lumière. Le produit de sa photo désintégration, pour l'instant non identifié est plus inhibiteur que le DACP.

## VII - L'ETHYLENE ET LE PROCESSUS DE MATURATION DES FRUITS

### VII - 1 - Rôle de l'éthylène dans le processus de maturation des fruits climactériques

Chez les F. C., la forte activité respiratoire et le dégagement autocatalytique de l'éthylène qui accompagnent la maturation sont nécessaires pour induire les modifications physico-chimiques et biochimiques telles que le changement de couleur, l'acquisition de la saveur, ou encore la perte de fermeté. Il est connu depuis longtemps que l'éthylène exogène, d'une part, déclenche le mûrissement des fruits verts aptes à mûrir et, d'autre part, accélère le mûrissement déjà initié des fruits (Yang et Hoffmann, 1984). Dans plusieurs cas de figure, le rôle direct de l'éthylène dans l'induction de la néo-synthèse d'ARNm a été démontré. Le traitement des fruits immatures par les inhibiteurs de l'action éthylénique (Lincoln *et al.*, 1987 ; Tucker et Brady, 1987 ; Davies *et al.*, 1988 ; Davies et Grierson, 1989) ou de l'éthylène exogène (Lincoln *et al.*, 1987 ; Maunders *et al.*, 1987), respectivement inhibe ou stimule l'accumulation d'ARNm spécifiques. Des études de traduction et de transcription *in vivo* et *in vitro* menées chez la tomate (Speirs *et al.*, 1984), la banane (Dominguez-Puigjaner *et al.*, 1992 ; Mugugaiyan, 1993) ou encore l'avocat (Christoffersen *et al.*, 1982) ont également montré une variation quantitative des protéines et des ARNm au cours de la maturation des fruits. Ces données ont permis de suggérer que l'éthylène régule le processus de maturation des F. C. en stimulant des modifications de l'expression des gènes. Dès lors, s'est développée une approche moléculaire visant, d'une part, à identifier les gènes dont l'expression varie au cours de la maturation et, d'autre part, à définir les fonctions des protéines correspondantes dans le processus de maturation. De nombreux gènes spécifiques de la maturation et induits par l'éthylène ont ainsi été isolés par différentes techniques de biologie moléculaire chez la tomate (Gray *et al.*, 1992 ; Zegzouti *et al.*, 1997), l'avocat (Dopico *et al.*, 1993), le kiwi (Ledger et Gardner, 1994) ou encore la banane (Medina-Suarez *et al.*, 1997 ; Clendennen et May, 1997). Certains de ces gènes ont été analysés en détail (estimation des tailles des ARNms et des protéines correspondantes, expression pendant la maturation, complexité génétique et localisation chromosomique). Les fonctions des protéines codées par ces gènes ont été définies par comparaison de séquence, et confirmées par expression transitoire en système hétérologue ou par la stratégie d'ARN anti-sens.

## VII - 2 - Les voies métaboliques dépendantes et indépendantes de l'éthylène

L'aspect moléculaire de la régulation de la maturation des F. C. par l'éthylène a connu une importante avancée avec l'avènement des plantes transgéniques et autres mutants naturels tel *Nr* (Never ripe) de tomate présentant une réduction considérable de la synthèse d'éthylène. Les plantes transgéniques ont été obtenues chez la tomate et le melon. Chez la tomate, la synthèse d'éthylène est inhibée par « extinction » des gènes d'ACC synthase (Oeller *et al.*, 1991) et d'ACC oxydase (Hamilton *et al.*, 1990), ou par surexpression du gène ACC désaminase de *Pseudomonas chloroaphis*, enzyme qui métabolise l'ACC avant sa conversion en éthylène (Klee *et al.*, 1991). Chez le melon, la synthèse d'éthylène est réduite par « extinction » du gène ACC oxydase (Ayub *et al.*, 1996). L'analyse phénotypique des individus transgéniques et du mutant *Nr* de tomate a montré que, par rapport aux fruits normaux, le phénotype mûr est fortement altéré chez toutes les plantes transgéniques, et partiellement réversible par l'éthylène exogène ou un analogue, le propylène (Hamilton *et al.*, 1990 ; Oeller *et al.*, 1991 ; Klee, 1993 ; Guis *et al.*, 1997). Cependant, l'analyse physico-chimique des différents aspects de la maturation a montré que, par rapport au témoin, seuls quelques aspects de la maturation étaient altérés chez les individus transgéniques. Dès lors, a été envisagée la coexistence des voies métaboliques, dépendante et indépendante de l'éthylène, pendant le processus de maturation ; chacune d'entre elles mettant en jeu des fonctions enzymatiques et des expressions géniques spécifiques.

### VII - 2 - 1 - Maturation et perte de fermeté

La perte de fermeté est un des aspects du mûrissement qui est très sensible à l'éthylène et qui est, par conséquent, dépendant de l'éthylène. La dégradation de l'amidon chez les fruits à réserve et, plus tard, la perte de turgescence, peuvent contribuer à la perte de fermeté. Il est toutefois admis que la déstructuration des polysaccharides majeurs des parois (cellulose, hémicellulose et pectine) reste l'événement majeur responsable de la perte de fermeté du fruit. Cette hypothèse a été démontrée par des études anatomique, biochimique et moléculaire. La dégradation, *in vivo*, des polymères pectiques au cours de la maturation des fruits a été mise en évidence dans de nombreux cas de figures (Huber, 1983 ; Sakurai et Nevins, 1997 ; Rose *et al.*, 1998). L'augmentation de l'activité de nombreuses hydrolases pariétales

(polygalacturonase, cellulase,  $\beta$ -galactosidase, pectinéméthylesterase, etc...) a également été rapportée pendant la maturation de nombreux fruits, et corrobore le dégagement éthylénique (Fischer et Bennett, 1991 ; Fils-Lycaon et Buret, 1991 ; Ketsa et Daengkanit, 1999). Par ailleurs, l'étude de l'expression des gènes codant pour les hydrolases pariétales a montré que nombre d'entre eux sont induits au cours de la maturation et positivement régulés par l'éthylène (Fischer et Bennett 1991 ; Harrimann *et al.*, 1991 ; Gonzalez-Bosch *et al.*, 1996 ; Smith *et al.*, 1998). Chez la poire, le traitement du fruit par de très faibles doses d'éthylène (0,1 ppm) ou de propylène induit la perte de fermeté mais pas d'autres aspects du mûrissement (Gerasopoulos et Richardson, 1996) et, chez le melon transgénique produisant seulement 0,5 % d'éthylène par rapport à la normale, la perte de fermeté est totalement bloquée (Guis *et al.*, 1997). Le cas du gène de la polygalacturonase a longuement été étudié chez la tomate. L'activité de cette enzyme est génétiquement contrôlée par l'éthylène (Sitrit et Bennett, 1998). En effet, l'application pendant 24 heures d'éthylène exogène (0,1 à 100  $\mu$ l/l) induit, proportionnellement, une accumulation de messagers PG. A une dose de 10  $\mu$ l/l, les messagers PG sont détectés au bout de 6 heures. A faible dose d'éthylène (0,1  $\mu$ l/l), les messagers, la protéine ainsi que l'activité PG sont induits au bout de 6 jours.

Si les activités de nombreuses hydrolases ont été associées au processus de maturation, la technique de transgénèse a définitivement démontré qu'aucune d'entre elles n'est exclusivement responsable de la perte de fermeté (Sheehy *et al.*, 1988 ; Giovannoni *et al.*, 1989 ; Tieman *et al.*, 1992 ; Hall *et al.*, 1993 ; Lashbrook *et al.*, 1998b). Toutefois, chez certains fruits, l'importance de certaines de ces enzymes a été associée à la perte de fermeté. C'est le cas de la polygalacturonase chez la tomate (Fischer et Bennett, 1991), de la cellulase chez l'avocat (Christoffersen *et al.*, 1982) et de la  $\beta$ -galactosidase chez le melon (Ranwala *et al.*, 1992), la mangue et la papaye (Ali *et al.*, 1995 ; 1998).

#### VII - 2 - 2 - La maturation et le changement de couleur

Deux mécanismes participent simultanément au changement de couleur lié au processus de maturation du fruit. Il s'agit de la dégradation de la chlorophylle, à l'origine de la perte de la couleur verte, d'une part, et de la néo-synthèse de pigments colorés, d'autre part (caroténoïdes, anthocyanines etc.) (Dean et Mattoo, 1991 ; Gray *et al.*, 1992 ; Trebitsh *et al.*, 1993 ; Ketsa *et al.*, 1999b).

La dégradation des chlorophylles est sous le contrôle de l'éthylène (Trebitsch *et al.*, 1993 ; Guis *et al.*, 1997). Parmi les enzymes impliquées, seule la chlorophyllase a pour l'instant été étudiée par rapport au processus de maturation. L'activité de l'enzyme augmente pendant la maturation, en corrélation avec la diminution de la chlorophylle, et la perte de la couleur verte (Trebitsch *et al.*, 1993 ; Moser et Matile, 1997 ; Ketsa *et al.*, 1999b ; Azuma *et al.*, 1999). Chez le citron, cette induction de l'activité est régulée par l'éthylène via une néo-synthèse protéique (Azuma *et al.*, 1999).

Selon la nature du pigment et selon le fruit, la néo-synthèse de pigments liée au processus de maturation peut mettre en jeu des voies métaboliques dépendantes ou indépendantes de l'éthylène. Chez la tomate, la mangue et le melon, le taux de caroténoïdes augmente au cours de la maturation, en corrélation avec l'émission d'éthylène et le changement de couleur (Murray *et al.*, 1993 ; Guis *et al.*, 1997 ; Ketsa *et al.*, 1999b). Chez le melon, l'inhibition de la synthèse d'éthylène par la technique ARN anti-sens n'a aucun effet sur l'accumulation des caroténoïdes du fruit et sur le changement de couleur de la chair (Guis *et al.*, 1997). Par contre, chez la tomate, elle entraîne la baisse du taux de caroténoïdes chez le fruit, avec perte de la couleur rouge (Oeller *et al.*, 1991 ; Murray *et al.*, 1993). En fait, l'expression du gène de la phytoène synthase, une des enzymes clé du métabolisme des caroténoïdes, est dépendante de l'éthylène chez la tomate (Gray *et al.*, 1992) alors qu'elle précède la synthèse d'éthylène chez le melon (Karvouni *et al.*, 1995).

### VII - 2 - 3 - Autres métabolismes associés au processus de maturation

En plus des métabolismes décrits plus en détail dans les précédents paragraphes, d'autres plus ou moins contrôlés au niveau moléculaire par l'éthylène sont également mis en jeu pendant la maturation des fruits. Parmi ceux-ci, on citera la saveur, l'arôme ou encore l'abscission du fruit.

La saveur du fruit dépend de l'équilibre entre les sucres et les acides organiques. Ces derniers (citrates et malates chez l'abricot) sont issus de la dégradation du saccharose, sucre majoritairement accumulé pendant les premières phases du développement de l'abricot. Dans certains cas, le métabolisme des sucres peut également générer les composés volatils impliqués dans l'arôme comme (les terpènes ou furanones). Les esters et les lactones sont également des constituants majeurs des arômes chez les végétaux. Ils proviennent de la dégradation respective des acides gras

et des acides aminés. Les lactones ont été identifiées comme les composés clés liés à la typicité d'arôme de l'abricot (Guichard et Fournier, 1990). La biochimie des arômes a longuement été étudiée et rapportée dans des revues de synthèse (Sanz *et al.*, 1997 ; Dean et Mattoo, 1991). Plusieurs voies métaboliques impliquées dans la synthèse des arômes ont été mises en évidence suivant la nature du précurseur. Il est généralement admis que l'émission des composés volatils coïncide avec la production d'éthylène chez les fruits climactériques. Cependant, la relation entre ces deux événements demeure inconnue (Golding *et al.*, 1998). L'abscission ou chute des fruits, résulte de l'action conjointe des hydrolases pariétales sur les cellules de la zone d'abscission et d'un phénomène mécanique lié au poids du fruit. En synergie avec d'autres hormones comme l'auxine, l'éthylène coordonne l'aspect biologique de l'abscission des fruits via la régulation des gènes spécifiques (Guis *et al.*, 1997 ; Brown, 1997).

## ***Matériel et Méthodes***

## **Matériel végétal**

### **I - RECOLTE, ECHANTILLONNAGE ET TRAITEMENT DES FRUITS**

La récolte, les traitements gazeux ainsi que l'évolution des paramètres de qualité des fruits ont été effectués par l'équipe de caractérisation physico-chimique dirigée par Barbara GOUBLE.

#### **I - 1 - Récolte et échantillonnage des fruits**

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés sur deux variétés d'abricot, Bergeron et Moniqui, cultivées en plein champ dans les vergers de l'INRA à Gotheron (Drôme) et Bellegarde (Gard). Les fruits Bergeron et Moniqui utilisés sont ceux récoltés dans leur phase finale de développement, respectivement en 1995 et en 1998.

Les récoltes de la variété Bergeron se sont étalées entre le 89<sup>ème</sup> et le 131<sup>ème</sup> jour après anthèse (JAA), de façon à obtenir une représentation des principaux stades de l'ontogenèse. Pour la variété Moniqui, les fruits ont été récoltés entre le 89<sup>ème</sup> et le 110<sup>ème</sup> JAA.

Compte tenu de la quantité variable de fruits récoltés d'un stade à l'autre du développement, liée aux conditions pédoclimatiques variables d'une variété et d'une année sur l'autre, des lots de 4 à 30 fruits ont été constitués par distribution aléatoire. Les propriétés physico-chimiques d'un des lots sont aussitôt déterminées. Ce lot, considéré comme lot de référence, permet de suivre la cinétique de maturation du fruit sur l'arbre. Les lots restants ont été utilisés pour les traitements à l'air, à l'éthylène, au 1-MCP (1-méthylcyclopropène) et au CO<sub>2</sub>, avant d'être soumis aux analyses physico-chimiques. Après caractérisation physico-chimique, les fruits destinés aux manipulations de biologie moléculaire ont été immédiatement dénoyautés, découpés en petits morceaux, congelés dans de l'azote liquide et conservés à -20 °C (pour l'extraction des protéines) ou -80°C (pour l'extraction des acides nucléiques).

#### **I - 2 - Traitements des fruits**

Outre l'évolution des fruits dans l'air, trois types de traitements gazeux ont été effectués. Il s'agit d'un traitement au CO<sub>2</sub>, à l'éthylène et au 1-MCP (1-méthylcyclopropène).



### II - 2 - 1 - Traitement des fruits au CO<sub>2</sub>

Cette étude ne concerne que les abricots de la variété Bergeron récoltés en 1995 entre le 89<sup>ème</sup> et 127<sup>ème</sup> JAA inclus. Les fruits issus de la récolte du 131<sup>ème</sup> JAA n'ont pas été utilisés car leur état de maturation très avancé a rendu difficile les manipulations. Le traitement a été effectué après chaque récolte sur deux lots de 6 à 11 fruits.

Pour ce faire, les fruits ont été maintenus en confinement dans des cocottes minute pendant 6 jours à 10°C en atmosphère contrôlée, composée d'air humidifié ou d'un mélange gazeux (10 % CO<sub>2</sub> / 20 % O<sub>2</sub> / 70 % azote). De la soude est ajoutée dans l'enceinte pour piéger le CO<sub>2</sub> produit par la respiration du fruit. Au terme du confinement, la fermeté de chacun des fruits est mesurée aussitôt. Avant le dosage de l'éthylène, les fruits stockés à 10°C sont maintenus environ 12 heures à température ambiante afin d'équilibrer leur température à 23°C, température de mesure.

### II - 2 - 2 - Traitements des fruits à l'éthylène et au 1-MCP (1-méthylcyclopropène)

Les traitements à l'éthylène et au 1-MCP ont été effectués sur les fruits Moniqui récoltés en 1998 entre le 89 et le 103<sup>ème</sup> JAA. Ceux récoltés à 106 et 110 JAA n'ont pas été traités à cause de leur état de maturation très avancé. Dans les deux cas, à chaque récolte, les traitements à l'éthylène et au 1-MCP sont effectués chacun sur deux lots de 4 fruits qui sont confinés à 23°C dans des cocottes minute de 18 litres.

Pour le traitement à l'éthylène, les fruits sont placés pendant 48 heures dans une atmosphère enrichie en éthylène (20 ppm). Pour les traitements au 1-MCP, ils sont maintenus sous une atmosphère enrichie constamment en 1-MCP (plus de 1 ppm). De la soude est ajoutée dans l'enceinte pour piéger le CO<sub>2</sub> issu de la respiration. Deux lots de 4 fruits sont exposés en continu à l'air. De la soude est également ajoutée au milieu pour piéger le CO<sub>2</sub> issu de la respiration du fruit, dans le but d'éviter un enrichissement de l'atmosphère en CO<sub>2</sub>, lequel pourrait agir sur le développement du fruit et la biosynthèse de l'éthylène. Au terme de ces traitements gazeux, les fruits sont transférés dans une cocotte minute de 6 l. Le suivi des fruits a consisté à mesurer leur émission d'éthylène toutes les 24 heures jusqu'à ce qu'une différence soit observée entre les 3 traitements (air, éthylène et 1-MCP). Sur la base de ce dernier critère, les fruits Moniqui récoltés à 89, 92 et 97 JAA ont été suivis pendant 7 jours alors que ceux récoltés à 99 et 103 JAA l'ont été respectivement pendant 5 et 4 jours.

## II - MESURE DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DES FRUITS

Nous ne décrivons ici que les méthodes de mesure de trois paramètres physico-chimiques (le dégagement éthylénique, la fermeté et la couleur) et celles relatives aux traitements gazeux des fruits, utilisées pour notre étude.

### II - 1 - Mesure de la fermeté

La fermeté est déterminée au moyen du pénétromètre PENELAUP (Abbal et Planton, 1990). La mesure consiste à relever la force maximale pour comprimer le fruit de 3 % de son épaisseur équatoriale entre deux plaques parallèles. Cette force, exprimée en Newton, est proportionnelle à la fermeté du fruit.

### II - 2 - Mesure du dégagement éthylénique

Pour les deux variétés considérées (Bergeron et Moniqui), l'éthylène est dosé à la fois sur les lots de référence, les lots « air » et sur ceux soumis aux traitements gazeux.

Le dosage est réalisé selon le protocole décrit par Chambroy *et al.* (1995). Après 1h30 de confinement dans un bocal, l'éthylène émis est dosé à température ambiante (23°C) par chromatographie en phase gazeuse à ionisation de flamme.

Pour la variété Bergeron récoltée en 1995, la mesure est effectuée sur chaque fruit du lot de référence. Pour les lots traités à l'air et au CO<sub>2</sub>, le dosage est réalisé sur l'ensemble des fruits du lot. Avant le dosage, les fruits traités au CO<sub>2</sub> sont maintenus quelques minutes à l'air libre de manière à assurer leur remise en température à 23°C.

Dans le cas des variétés Bergeron et Moniqui récoltées en 1998, le dosage de l'éthylène est réalisé sur l'ensemble des fruits du lot, tant pour les fruits de référence que pour les autres fruits soumis aux traitements gazeux.

<u>JAA</u>	Caractéristiques	<u>Stades Physiologiques</u>	
<u>BERGERON</u>	89	Aucune trace d'éthylène détectée, fruit ferme (valeur F max = 124), aucun changement de couleur (valeur H° = 113) Le dégagement éthylénique et la fermeté du fruit sont inhibés par le CO <sub>2</sub> après récolte	<b>Vert Immature (Vim)</b>
	103	Aucune trace d'éthylène détectée, fruit ferme (valeur F max = 124), début du changement de couleur (valeur H° = 111) Le dégagement éthylénique et la fermeté du fruit sont inhibés par le CO <sub>2</sub> après récolte	<b>Vert mature (Vim)</b>
	110	Premières traces d'éthylène détectées, début de perte de fermeté (valeur F max = 98), valeur H° (103) Le dégagement éthylénique et la fermeté du fruit sont inhibés par le CO <sub>2</sub> après récolte	<b>Tournant (Tr)</b>
	124	Poursuite du dégagement d'éthylène, de la perte de fermeté et du changement de couleur Le dégagement éthylénique et la fermeté du fruit sont inhibés par le CO <sub>2</sub> après récolte	<b>Mi-mûr (Mm)</b>
	127	Maximum d'éthylène émis et de la perte de fermeté. Poursuite du changement de couleur Le dégagement éthylénique et la fermeté du fruit sont inhibés par le CO <sub>2</sub> après récolte	<b>Mûr (M)</b>
	131	Début de baisse de l'éthylène émis, maximum du changement de couleur atteint Le dégagement éthylénique et la fermeté du fruit sont inhibés par le CO <sub>2</sub> après récolte	<b>Sur-Mûr (Sm)</b>
<u>JAA</u>	Caractéristiques	<u>Stades Physiologiques</u>	
<u>MONIQUI</u>	89	Aucune trace d'éthylène détectée même après traitement à l'éthylène exogène, aucun changement de couleur (valeur H° = 115)	<b>Vert Immature (Vim)</b>
	97	Aucune trace d'éthylène détectée chez le fruit sur l'arbre. Emission d'éthylène après application de l'éthylène exogène, début du changement de couleur (valeur H° = 111)	<b>Inductible (In 1)</b>
	99	Aucune trace d'éthylène détectée chez le fruit sur l'arbre. Emission d'éthylène après application de l'éthylène exogène, poursuite du changement de couleur (valeur H° = 107)	<b>Inductible 2 (In 2)</b>
	103	Aucune trace d'éthylène détectée chez le fruit en maturité sur l'arbre. Emission d'éthylène après application de l'éthylène exogène, poursuite du changement de couleur (valeur H° = 106)	<b>Inductible 3 (In 3)</b>
	106	Début d'émission d'éthylène chez le fruit en maturité sur l'arbre. Emission d'éthylène après application de l'éthylène exogène, poursuite du changement de couleur (valeur H° = 99)	<b>Tournant (Tr)</b>
	110	Maximum d'émission d'éthylène par le fruit sur l'arbre et du changement de couleur (valeur H° = 95)	<b>Mûr (M)</b>

**Tableau 1 : Relations entre les caractéristiques physico-chimiques et le stade physiologique des variétés Bergeron et Moniqui utilisés dans cette étude.**

### **II - 3 - Mesure de l'évolution de la coloration**

La couleur de chaque fruit est évaluée après chaque récolte à l'aide de l'appareil Colorquest (Hunterlab, France) suivant l'espace colorimétrique  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  (CIE, commission internationale de l'éclairage, 1964). Les grandeurs chromatiques  $L^*$ ,  $a^*$  et  $b^*$  correspondent respectivement à la clarté, la teinte et la saturation, 3 caractéristiques fondamentales de la couleur. Les variables  $a^*$  et  $b^*$  correspondent respectivement aux axes de couleur rouge-vert et jaune-bleu. L'angle de teinte  $H^\circ$  ( $H^\circ = \text{tg}^{-1}[b^*/a^*]$ ) a été utilisé pour exprimer les résultats. L'évolution de la valeur de  $H^\circ$  est inversement proportionnelle au changement de couleur du fruit.

Un état physiologique a été attribué aux différents stades de récolte des fruits Bergeron et Moniqui en fonction de l'évolution de leurs paramètres physico-chimiques (dégagement éthylénique, évolution de la coloration et perte de fermeté), pendant la maturation sur l'arbre et après récolte. L'ensemble est présenté dans le tableau 1.

## **Méthodes de biologie moléculaire**

### **I - MÉTHODES RELATIVES AUX ACIDES NUCLEIQUES**

#### **I - 1 - Extraction et purification des acides nucléiques**

##### **I - 1 - 1 - Extraction et purification d'ARN totaux**

Pendant nos travaux, la méthode décrite par Fils-Lycaon *et al.* (1996) a été utilisée pour extraire les ARN totaux de tissus autres que ceux du fruit (graine, jeune feuille, jeune feuille blessée, fleur, racine) qui utilise le GPS (glycine phosphate sodium) 1X (glycine 0,2 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M, NaCl 0,6 M, pH 9,5) comme tampon d'extraction. Pour extraire les ARN totaux de fruit, une méthode adaptée de celle de Wan et Wilkins (1994) a été mise au point lors de nos travaux. Elle diffère de la première par son tampon d'extraction, le GBS (glycine borate sodium) 1X (glycine 0,2 M, acide borique 0,1 M, NaCl 0,6 M, pH 9,6) à 65 °C.

L'extraction est effectuée à partir de 7 g de poudre de matériel congelé, préparée juste avant l'extraction à partir de matériel végétal préalablement conservé à -80°C. Le broyage des morceaux d'abricot congelés est réalisé sous azote liquide dans un broyeur à bille de type Danguomeau. La poudre est soumise initialement à une homogénéisation de 10 min à 65 °C dans un mélange composé de : 0,46 g de DIECA (sodium diéthylthiocarbamate acide), 12 ml de solution tampon d'extraction (tampon GBS 1X préchauffé à 65 °C, 5 % (p/v) de SDS, 1 % (p/v) de Nonidet NP-40, 2 % (p/v) de PVPP, et 2,5 % (v/v) de β-mercaptoéthanol. Le DIECA est un agent réducteur empêchant partiellement la formation de quinones qui peuvent dégrader les ARN. Le borate a pour fonction de piéger les polyphénols en formant avec eux des complexes insolubles via les ponts hydrogènes. Le Nonidet NP-40 (octylphénoxy-polyéthoxyéthanol), un détergent non ionique, favorise l'éclatement des membranes cellulaires. Le SDS (sodium dodecyl sulfate), un détergent anionique solubilise à chaud les parois cellulaires, et le β-mercaptoéthanol dénature les protéines. Du phénol (12 ml à pH 8,0 et équilibré avec du Tris-HCl à température ambiante) est ensuite ajouté et le mélange est homogénéisé pendant 10 min à 65°C. Le phénol est un agent organique dénaturant qui permet de solubiliser et de précipiter les protéines. Après centrifugation (20 min à 13.000 g), du chlorure de potassium (concentration finale de 160 mM) est ajouté à la phase aqueuse contenant les acides nucléiques, des carbohydrates et des protéines résiduelles. Le mélange est homogénéisé et laissé pendant 1 h dans la glace afin de provoquer la précipitation de la majorité des carbohydrates et des protéines résiduelles. Après

centrifugation (20 min à 15.000 g), les ARN totaux contenus dans la phase aqueuse sont purifiés sélectivement sur cellulose CC 41 (Whatman) suivant le protocole décrit par Fils-Lycaon *et al.* (1996). Dans ces conditions, le rendement est d'environ 50 µg d'ARN totaux par gramme de poudre de tissu congelé.

#### I - 1 - 2 - Purification des ARN messagers

Les ARN messagers sont purifiés à partir des ARN totaux par chromatographie d'affinité sur oligo dT, à l'aide du kit «Poly A<sup>+</sup> Tract mRNA Isolation System II» de chez «Promega» (Lyon, France). Le principe du Kit consiste, dans un premier temps, à piéger les ARN messagers avec une sonde oligo(dT) biotynilée, elle-même piégée par des particules magnétiques greffées à la streptavidine. La phase aqueuse, enrichie en ARN ribosomiques et en ARN de transfert, est éliminée. La fraction enrichie en ARN messagers est ensuite éluée dans de l'eau préalablement traitée au DEPC (diéthylpyrocarbonate).

#### I - 1 - 3 - Extraction et purification d'ADN génomique

L'ADN génomique est extrait de jeunes feuilles d'abricot Bergeron selon le protocole décrit par Bernatzky et Tanksley (1986).

#### I - 1 - 4 - Extraction et purification d'ADN plasmidique

Le plasmide est une petite molécule d'ADN circulaire contenue dans la bactérie et indépendante de l'ADN génomique. Lors de nos travaux, nous avons utilisé le protocole standard d'extraction à petite échelle et par lyse alcaline décrit par Sambrook *et al.* (1989), à partir de 1,5 ml de suspension bactérienne. Ce protocole détaillé en annexe 1 consiste à :

- lyser les membranes bactériennes par incubation dans 5 ml de solution I (glucose 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, pH 8) contenant du lysosyme (concentration finale de 0,33 mg/ml) et 12 ml de solution II (NaOH 0,2 M, SDS 1 %),

- séparer l'ADN plasmidique, ainsi que les ARN et les protéines de faible masse moléculaire, des grosses molécules (ADN génomique, ARN et protéines de haute masse moléculaire) par précipitation différentielle dans 9 ml de solution III (Acétate de potassium 3 M, acide acétique glacial 5 M).

- éliminer les ARN et autres protéines résiduels, respectivement par traitement à l'ARNase A (20 µg/ml) et extraction au phénol/chloroforme (v/v).

## **I - 2 - Analyses quantitative et qualitative des acides nucléiques**

### **I - 2 - 1 - Analyse quantitative des acides nucléiques**

La quantité d'acides nucléiques extraits est évaluée en mesurant la densité optique (DO) à 260 nm. Une unité de DO à 260 nm d'une solution d'ARN et d'ADN (génomique ou plasmidique) correspond respectivement à une concentration de 40 µg et 50µg par ml de solution. Plus largement, un spectre d'absorption est réalisé entre 210 et 320 nm afin de déceler la présence d'éventuels carbohydrates et de protéines polluants qui absorbent respectivement à 230 et 280 nm. Les rapports  $DO_{260}/DO_{230}$  et  $DO_{260}/DO_{280}$  permettent d'estimer le degré de pureté de l'échantillon d'acides nucléiques : ces rapports doivent être voisins de 2,0.

### **I - 2 - 2 - Analyse qualitative des acides nucléiques**

L'analyse qualitative des acides nucléiques est faite par électrophorèse. Au cours de nos travaux, nous avons couramment utilisé deux types d'électrophorèse, l'une en conditions dénaturantes, et l'autre en conditions non dénaturantes.

#### **⇒ L'électrophorèse en conditions non dénaturantes**

L'électrophorèse en conditions non dénaturantes permet de séparer les molécules d'acides nucléiques sans affecter leur structure secondaire comme les boucles (cas des ARN) ou la structure double brin (cas de l'ADN et des plasmides).

L'électrophorèse est réalisée sur un gel d'agarose « HMP (high melting point) » ou « LMP (low melting point) » de 0,8 à 2,5 % préparé dans du TAE 1 X (40 mM Tris/acétate, EDTA 1 mM, pH 8). Les deux types d'agarose diffèrent par leur température de gélification et de fusion. A une concentration de 1,5 %, celles du « HMP » sont respectivement d'environ 37 et 90°C alors celles du « LMP » sont respectivement d'environ 27 et 67°C. Le volume de dépôt est composé d'un extrait de la solution d'acides nucléiques à analyser et de la solution tampon de charge «Blue/Orange 6X Loading Dye » de chez Promega (concentration finale 1X). L'ensemble est mis à migrer sous une tension de 50 V, dans la solution tampon de migration TAE 1X. Les acides nucléiques sont visualisés sous rayons ultra violets (U.V.) (41 mW.cm<sup>2</sup>) après coloration au bromure d'éthidium (BET) (concentration finale de 0,1 mg/ml) dans du TAE 1X.

Nous avons utilisé ce type d'électrophorèse pour déterminer la taille des molécules d'acides nucléiques. Pour cela, trois types de « kits » marqueurs de masse moléculaire ont été utilisés. Il s'agit du « 100 pb DNA Ladder », du «  $\lambda$  DNA Hind III Marker » et du «  $\lambda$  DNA EcoR I/Hind III Markers ». Ils sont composés de fragments d'ADN double brin dont les tailles sont comprises respectivement entre 0,1 et 1,5 kpb (11 fragments), 0,1 et 21 kpb (13 fragments), et 0,1 et 23 kpb (8 fragments).

⇒ L'électrophorèse en conditions dénaturantes

Elle a été utilisée uniquement sur les préparations d'ARN totaux dans le but de vérifier, d'une part, l'absence de pollution par de l'ADN génomique et, d'autre part, l'absence de dégradation.

Pour ce faire les échantillons d'ARN sont traités selon le protocole décrit par Meinkoth et Wahh (1984). Cinq  $\mu$ g d'ARN sont séparés par électrophorèse en conditions dénaturantes sur 50 ml de gel d'agarose de type « HMP » de 0,8 à 1,2 % contenant du formaldéhyde à 10 %, préparé dans de l'eau distillée et autoclavée, et du MOPS (acide 3-[N-morpholino] propanesulfonique) 1X. La solution mère de MPOS d'une concentration de 20X est composée de 20 mM de MOPS, 5 mM d'acétate de sodium, 1 mM EDTA, pH 7,5. Les ARN sont dénaturés pendant 15 min à 65 °C dans un mélange contenant du MOPS 1X, 20 % (v/v) de formaldéhyde et 50 % (v/v) de formamide purs. Au terme de la dénaturation, le mélange est placé dans la glace afin d'éviter la renaturation des ARN. La solution tampon de charge ARN est ajoutée au mélange à une concentration finale 1X (0,025 % bleu de bromophénol, 0,025 % xylène cyanol, 3 % glycérol préparée dans de l'eau distillée et autoclavée). L'ensemble est mis à migrer sous une tension de 50 V, dans la solution tampon de migration composée du MOPS 1X et du formaldéhyde 10 %. Les ARN totaux sont colorés et visualisés dans des conditions identiques à celles décrites précédemment pour l'électrophorèse en conditions non dénaturantes.

Si tous les contrôles effectués sur la préparation des acides nucléiques sont concluants, celle-ci est considérée comme adéquate, elle est alors concentrée. Pour cela, les acides nucléiques totaux sont précipités pendant une nuit à -20 °C dans 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M à pH 5,2 et 2 volumes d'éthanol pur. Le culot d'acides nucléiques est obtenu par centrifugation à 4°C, pendant 1 heure à 13.000 g. Après deux rinçages dans de l'éthanol à 70 %, le culot d'ADN (génomique et plasmidique) est repris dans de l'eau distillée autoclavée de manière à avoir une concentration d'environ 10 mg/ml. Quant au culot d'ARN, il est repris dans de l'eau distillée, autoclavée et traitée au DEPC (concentration finale d'environ 5  $\mu$ g/ $\mu$ l). Pour les manipulations ultérieures, les acides nucléiques sont conservés à - 80°C par fraction



de 50 µg pour les ARN totaux et 1,5 ml pour les ADN. Cette procédure permet d'éviter, par la suite, de multiples décongelations et congélations, facteur important de dégradation des acides nucléiques, notamment des ARN.

### **I - 3 - Synthèse *in vitro* de l'ADN**

#### **I - 3 - 1 - Considérations générales**

Nombre de manipulations de biologie moléculaire utilisées dans nos travaux consistent en la synthèse d'ADN (synthèse et amplification de fragments d'ADNc, construction de banque d'ADNc, marquage de sondes, etc ...). Dans tous les cas de figure, en plus d'un milieu tampon adéquat, la synthèse d'ADN *in vitro* nécessite un substrat (les dNTPs), une ou plusieurs amorces, une matrice (l'ADN ou l'ARN) et une enzyme. Cette dernière est une ADN polymérase, ADN dépendante (pour une matrice ADN) et ARN dépendante ou transcriptase inverse (pour une matrice ARN).

La synthèse d'ADN peut être simple ou amplifiée. Dans le cas d'une synthèse simple, on utilise généralement une polymérase qui fonctionne à des températures comprises entre 37 et 55°C. Dans le cas d'une synthèse amplifiée, on utilise une polymérase thermostable qui puisse résister aux températures élevées de dénaturation de l'ADN matrice pendant les nombreux cycles effectués.

L'amorce est la petite séquence d'acide nucléique linéaire à partir de laquelle débute la synthèse de l'ADN. Les amorces peuvent être de 2 grands types :

- aléatoire, leur taille est alors d'environ 6 à 10 bases,
- spécifique, leur taille variant alors le plus souvent de 17 à 25 bases.

Pour une amorce spécifique, sa séquence est unique si celle de la matrice est connue exactement. Dans le cas contraire, on ne peut pas utiliser une amorce unique établie à partir de la séquence du gène d'une autre espèce. Ceci est lié, d'une part, à la plus ou moins grande conservation de la séquence du gène d'une espèce à l'autre et, d'autre part, à la dégénérescence du code génétique. Il va alors falloir définir une amorce toujours spécifique, mais cette fois-ci dégénérée. Lors de nos travaux, nous avons utilisé plusieurs amorces spécifiques dont certaines sont dégénérées et d'autres non. L'ensemble de leur séquence est décrit dans le tableau 2. Parmi ces amorces, deux ACS-CS et ACS-HAS ont été définies dans cette étude.

Noms	gènes	Séquences	Dégénérescence	Tm°C
ACS-CS	<i>ACC synthase</i>	5'- GAYGCNTTYTNNITCCNWCNCCWTAYTATCC -3' D A F L L P T P Y Y P	64	55
ACS-JAS	''	5'- CANACNCKRAACCANCCNGGYTC -3' E P G W F R V W	32	55
OLE-2	''	5'- GCTCTAGATAYTTYGAYGGNTGGAARGC-3' <i>XbaI</i> Y F D G W K	64	54
OLE-4	''	5'- GCGAATTCRTCCATRTTNGCRAARCA -3' <i>EcoRI</i> C F A N M D	64	52
OLE-5	''	5'- CCTGATCARATGGGNYTNGCNGARAA -3' <i>BclI</i> Q M G L A E N	512	54
OLE-6	''	5'- CTCTGCAGCRAARCANACNCKRAACCA-3' <i>PstI</i> F V R C F A	266	56
ACS1-S	<i>PA-ACSI</i>	5'- GACAAAGATATAAAAGTGGCG -3' D K D I K W R	0	42,5
ACS1-AS	''	5'- GACAAAGATATAAAAGTGGCG -3' W D R L L N V	0	42,5
ACS2-S	<i>PA-ACS2</i>	5'- AAAGCATACGATAGAAAACCC -3' K A Y D R N P	0	42,5
ACS2-R	''	5'- TCCACGCACTTAAAAGAAGACC -3' G S S F C V E	0	58,4
$\beta$ Gal-3'S	<i><math>\beta</math>-Galactosidase</i>	5'- GACCAATGTTGACATCAGTTC -3' M T N V D I S S	0	45,3
Pme-3'S	<i>Pectinéméthylesterase</i>	5'- TACGCTGTACTTGCATTATGG -3' D T L Y L H Y G	0	45,3
Rib26-S	<b>Ribosomique</b>	5'- TTACTIONTCCGTGAAACGG -3'	0	42
Rib26-AS	''	5'- TCACAATGATAGGAAGAGCC -3'	0	42
T3	<b>Plasmide</b>	5'- ATTAACCCCTACTAAAGGG -3'	0	46
T7	''	5'- TAATACGACTCACTATAGGG -3'	0	46

---

UF	”	<b>5'- GTAAAACGACGGCCAGT -3'</b>	0	50
UR	”	<b>5'- CAGGAAACAGCTATGACC -3'</b>	0	50
Adaptateur-AS	<b>Sites de restriction</b>	<b>5'- GACTCGAGTCGACATCG-3'</b>	0	50
(dT)Adaptateur-AS	”	<b>5'- GACTCGAGTCGACATCGA- T<sub>17</sub>- 3'</b>	0	50

---

**Tableau 2 : Liste des amorces utilisées pour la synthèse *in vitro* de l'ADN.**

Les séquences d'acides aminés conservées correspondant aux amorces sont indiquées en gras en dessous. Les amorces dégénérées OLE-2, OLE-2, OLE-4, OLE-5, OLE-7 ont été définies par Mason et Botella (1997). Les amorces Adaptateur-AS et (dT)Adaptateur-AS ont été définies par Frohman *et al.*, (1988) alors que ACS-CS et ACS-JAS dégénérées ont été définies au cours de nos travaux. Les amorces T3, T7, UF et UR sont des séquences communes aux vecteurs et couramment utilisées en biologie moléculaire. Gènes ribosomique, *PA-ACSI* et *PA-ACS2* sont ceux isolés chez l'abricot et enregistrés dans la banque de données GenBank, respectivement sous les numéros d'accès AF003997, AF184076, AF184077. Les séquences nucléotidiques des gènes de pectinéméthylestérase et de  $\beta$ -galactosidase ayant servi à définir respectivement les amorces PME-3'S et  $\beta$ Gal-3'S sont celles isolées chez l'abricot par Mbéguié-A-Mbéguié (1996).

	10	20	30	40	50
Pomme	CLADPG	EAVL	IPTPYYP	PGFD	RDLK
Tomate	CLANQG	DAFL	LPTPYYP	PGFD	RDLK
Pomme de terre	CLADPG	DAFL	LPTPYYP	PGFD	RDLK
Riz	CLADHG	DAFL	IPTPYYP	PGFD	RDLK
Melon	CLADPG	DAFL	IPSPYYA	AFD	RDLQ
Arabidopsis	CLADPG	DVFL	IPSPYYA	AFD	RDLR
Tabac	CLADTG	DAFL	VSPYYPA	AFN	RDLR
Oeillet	CLANPG	DAFL	IPSPYYP	AFN	RDLR
Haricot	CLADPG	EAF	VPIPYYP	PGFD	RDLR
Orchidée	ILADRG	DALL	VPTPYYP	PGFL	RDLQ

Acides aminés conservés	D/E	A	F/V	L	I/L/V	P	T/S/I	P	Y	Y	P/A	G/A	F	D/N/L
Pomme	GAA	G	GTT	CTT	ATT	CCT	ACC	CCA	TCA	TAC	CCA	GGA	TTT	GAT
		C												
		C												
Tomate	GAT	GCT	TTT	CTC	CTT	CCT	ACC	CCA	TAC	TAT	CCT	GGA	TTC	GAT
Patate	GAT	GCT	TTT	CTC	CTT	CCC	ACT	CCA	TAC	TAC	CCT	GGA	TTT	GAT
Riz	GAC	GCC	TTC	CTC	ATC	CCC	ACC	CCA	TAC	TAC	CCA	GGG	TTC	GAC
Melon	GAT	GCG	TTT	TTG	ATT	CCT	TCT	CCA	TAT	TAT	GCA	GCG	TTT	GAT
Arabidopsis	GAC	GCT	TTC	TTG	CTT	CCC	ACG	CCA	TAT	TAT	CCA	GGG	TTT	GAT
Tabac	GAT	GCA	TTC	TTA	GTA	CCT	TCA	CCA	TAC	TAT	CCA	GCA	TTT	AAC
Oeillet	GAC	GCC	TTT	TTA	ATT	CCG	TCT	CCT	TAT	TAT	CCC	GCA	TTT	AAC
Haricot	GAG	GCA	TTC	TTA	GTG	CCC	ATT	CCC	TAT	TAT	CCA	GGC	TTT	GAC
Orchidée	GAT	GCC	TTA	CTT	GTC	CCA	ACT	CCT	TAT	TAT	CCA	GGG	TTT	TTG

Bases les plus fréquentes	G	A	T	G	C	C	T	T	T	T	T	C	A	T	T	C	C	C	A	T	A	T	T	A	T	C	C	A	G	G	A	T	T	T	G	A	T					
Possibilités nucléotidiques de 5' vers 3'	G	A	T	G	C	C	T	T	T	T	T	C	A	T	T	C	C	T	A	C	C	C	T	G	G	A	T	T	T	G	G	A	T	T	T	G	A	T				
		A			T		G	C		C		C	C		C		C	T	T	T		T		A	C		G		C	G				C	A	T	C					
		C			G		A		G		G		A		G		G		A		C				T		C		C						T	G						
		G			A			A		G		A		G		A		G																								
Séquence nucléotidique en code IUB	G	A	N	G	C	N	K	T	H	Y	T	N	V	T	N	C	C	N	W	Y	N	C	C	H	T	M	H	T	A	Y	S	C	H	G	S	V	T	T	Y	D	W	B
Amorce choisie	G	A	Y	G	C	N	T	T	Y	Y	T	N	N	T	T	C	C	N	W	C	N	C	C	W	T	A	Y	T	A	T	C	C										

$$T_m = 4 \times (G+C+S) + 3,3 \times (V+B) + 3 \times (R+M+K+Y+N) + 2,7 \times (D+H) + 2 \times (A+T+W) + 0 (I)$$

$$\text{Dégénérescence} = 2^{(R+M+W+K+S+Y)} \times 3^{(H+B+D+V)} \times 4^{(N)}$$

**Figure 9 :** Les principales étapes de la recherche de l'amorce dégénérée ACCS-CS. Les séquences partielles des polypeptides correspondant aux gènes d'ACC synthase isolés chez différentes espèces sont alignées à l'aide du logiciel ESEE. Les gènes d'ACC synthase sont ceux de pomme (n° d'accèsion L31347), de tomate (n° L34171), de patate (n° Z27233), de riz (n° A47729), de melon (n° D30805), d'Arabidopsis (n° Q06402), de tabac (n° Q07262), d'œillet (n° P27486), de haricot (n° S26214) et d'orchidée (n° L07883). Les lettres S, V, B, R, M, K, Y, D, H, W, et N utilisées pour calculer la T<sub>m</sub> et la dégénérescence, constituent le code IUB détaillé en annexe.

### I - 3 - 2 - Méthode de recherche d'une amorce spécifique et dégénérée : exemple de l'amorce ACCS-CS

Les différentes étapes de cette recherche sont décrites dans la Fig. 9.

La première étape consiste à importer de banques de données les séquences d'acides aminés correspondant aux gènes d'ACC synthase isolés chez d'autres espèces. Les différentes séquences d'acides aminés sont ensuite alignées sur ordinateur à l'aide du logiciel «ESEE» (« The Eyeball Sequence Editor, Version 1.0 »), ce qui permet de définir les régions conservées d'une séquence à l'autre. L'amorce dégénérée correspondant à chaque région conservée est définie sur la base du code de « international unit of biochemistry » (IUB) et du code génétique (voir annexe 2). En cas de dégénérescence trop importante de la séquence, il est possible d'incorporer une ou plusieurs inosines, nucléotide ne présentant pas de spécificité d'appariement.

Le choix du couple d'amorces utilisées en PCR est effectué sur la base des critères suivants :

- la différence de température d'appariement des différentes amorces doit être la plus faible possible pour les utiliser ensemble,
- le degré de dégénérescence doit être le plus faible possible, car il est proportionnel au nombre de types d'amorces différentes et inversement proportionnel à leur degré de spécificité au gène d'intérêt,
- l'extrémité 3', en particulier, doit être la plus spécifique possible pour permettre un bon début de synthèse par la polymérase,
- les amorces choisies (« sens » et « antisens ») doivent être, si possible, situées de part et d'autre d'un ou plusieurs introns du gène de façon à déceler des produits PCR résultant d'une éventuelle contamination par de l'ADN.

Une fois les séquences d'amorces définies, leur synthèse est réalisée par Eurogentec (Seraing, Belgique).

Constituants	Concentrations finales		
	<i>Tfl</i>	<i>AmpliTaq</i>	<i>Expand<sup>TM</sup> High fidelity PCR system</i>
Tampon PCR	1 X	1 X	1 X
dNTPs	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM
Amorce sens	1 µM	1 µM	0,4 µM
Amorce antisens	1 µM	1 µM	0,4 µM
MgCl <sub>2</sub>	-	2,5 mM	1,5 mM
MgSO <sub>4</sub>	1 mM	-	-
		< 1 µg	< 1 µg
Matrice ADN	< 0,5 µg	<= 5 µl d'extrait RT	<= 5 µl d'extrait RT
Enzyme	5 U	2,5 U	2 U

Conditions standards des réactions PCR			
	T°C	Durée	
	94°C	30 s à 3 min	Dénaturation
30 à 40 cycles	42 à 55°C	30 s à 1min	Hybridation
	68 ou 72	1 à 2 min	Elongation

**Tableau 3 :** Différentes enzymes DNA polymérase DNA-dépendante utilisées lors de nos travaux, la composition de leur milieu réactionnel respectif (A) et les conditions standard des réactions PCR (B).

L'ensemble des constituants du milieu réactionnel est fourni sous forme de kit exception faite des amorces, des dNTPs et de la matrice ADN. La réaction PCR est réalisée dans un thermocycleur de type GenAmp PCR system 2400 de chez Perking Helmer (Courtaboeuf, France).

### I - 3 - 3 - La réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La PCR est une technique mise au point par Saiki *et al.* (1985). Elle permet de synthétiser et d'amplifier l'ADN. Cette technique, dont le principe est détaillé en annexe 3, est basée sur des cycles d'amplification. Chaque cycle est composé :

- d'une dénaturation qui permet de séparer les doubles brins d'ADN matrice et de les linéariser,
- d'une hybridation au cours de laquelle l'amorce va s'apparier à la séquence de l'ADN matrice qui lui est complémentaire et,
- d'une élongation au cours de laquelle la polymérase va synthétiser l'ADN à partir de l'extrémité 3'OH de l'amorce dans le sens 5'P vers 3'OH.

La réaction est faite dans un thermocycleur de type GenAmp PCR system 2400 (Perking Helmer, Courtaboeuf, France). Trois types d'ADN polymérase ont été utilisés dans cette étude. Il s'agit de la polymérase de type *Tfl* (*Thermococcus flavus*) de chez Promega (Lyon, France), l'*AmpliTaq* polymérase de chez Perking Helmer et l'*Expand<sup>TM</sup> High Fidelity PCR system* de chez Roche Molecular Biochemicals (Meylan, France). Les températures optimales de ces trois enzymes sont respectivement de 68, 72 et 72°C. Les milieux réactionnels correspondant à ces différentes enzymes ainsi que les conditions standards de PCR utilisées lors de nos travaux sont respectivement décrits dans les tableaux 3A et 3B.

### I - 3 - 4 - La transcription inverse (RT)

La transcription inverse est la réaction qui consiste à synthétiser une molécule d'ADN à partir d'une séquence d'ARN. Le fragment d'ADN ainsi généré est appelé ADN complémentaire (ADNc). La réaction RT est catalysée par une transcriptase inverse d'origine virale, et le détail de son principe est décrit en annexe 4. Elle est généralement suivie d'une amplification par PCR du fragment d'ADNc, d'où son appellation RT-PCR. Dans nos travaux, nous avons utilisé la transcriptase inverse purifiée de la Maloney Murine leucaemia virus (MMuLV) de chez Roche Molecular Biochemicals.

La RT est réalisée dans des tubes Eppendorf de 0,2 ml à paroi fine. Le protocole standard est le suivant : 1 µg d'ARN totaux ou 50-100 µg d'ARNm ainsi que l'amorce antisens (1 µg) sont dénaturés pendant 10 min à 65°C dans le thermocycleur afin d'éliminer leurs structures secondaires éventuelles. Au terme de la dénaturation, le

mélange est aussitôt stabilisé par incubation dans la glace. A ce précédent mélange, sont ensuite ajoutés 50 U de la MMuLV transcriptase inverse, 1 mM de dNTPs, 10 mM de DTT, et la solution tampon MMuLV 1X fournie avec l'enzyme. Le premier brin d'ADNc est synthétisé par incubation du mélange réactionnel pendant 1 heure à 42°C. Une fois synthétisé, le brin d'ADNc est conservé à 4°C jusqu'à son amplification par PCR.

### I - 3 - 5 - Amplification de l'extrémité 3' des ADNc rares (3'RACE)

La 3'RACE est une technique mise au point par Frohman *et al.* (1988). Comme son nom l'indique, elle est couramment utilisée pour isoler la séquence complète d'un gène faiblement exprimé et dont on connaît une partie de la séquence. La 3'RACE est une variante de la RT et le détail de son principe est décrit en annexe 5. Tout comme la RT, la 3'RACE est associée à la PCR et fait appel à une transcriptase inverse. Cependant, elle diffère de la RT-PCR en ce sens qu'elle nécessite en particulier des amorces spécifiques alors que la RT-PCR peut être utilisée aussi bien avec toutes types d'amorces spécifiques dégénérées ou non. Dans nos travaux, cette technique a été utilisée pour isoler du fruit d'abricot, les extrémités 3' des gènes codant pour la pectinéméthylestérase (PME) et la  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ Gal).

Trois amorces spécifiques ont été utilisées. Il s'agit des amorces PME-3'S et  $\beta$ -Gal-3'S, Adaptateur-S et oligo(dt)Adaptateur-AS, dont les séquences sont décrites dans le tableau 2. Les amorces PME-3'S et  $\beta$ Gal-3'S sont spécifiques des fragments des gènes d'abricot codant respectivement pour la PME et la  $\beta$ Gal (Mbéguié-A-Mbéguié, 1996). Quant aux amorces adaptateur et oligo(dt)Adaptateur-AS, elles ont été décrites dans la littérature (Frohman *et al.*, 1988) et sont essentiellement constituées des sites de coupure de nucléases rares. Un  $\mu$ g d'amorce antisens oligo(dt)Adaptateur-AS est utilisé pour synthétiser le premier brin d'ADNc par transcription inverse comme précédemment décrit. Deux fractions de cinq  $\mu$ l de cette solution d'ADNc sont ensuite amplifiées séparément par 30 cycles PCR, respectivement avec les amorces PME-3'S et Adaptateur-AS,  $\beta$ Gal-3'S et Adaptateur-AS. Nous avons utilisé l'ADN polymérase de type *Expand<sup>TM</sup> High fidelity PCR system*. Les conditions standards de PCR ont été légèrement modifiées de la manière suivante : 30 s de dénaturation, 1 min d'hybridation à 50°C et 1 min 30 s d'élongation à 72°C. Après les 10 premiers cycles d'amplifications, 20 cycles supplémentaires sont effectués avec une incrémentation de 20 s à chaque étape d'élongation.



#### **I - 4 - Purification des fragments d'acides nucléiques synthétisés *in vitro***

Dans cette étude, nous avons couramment purifié des fragments d'acides nucléiques synthétisés *in vitro*, que ce soit pour le clonage, le séquençage ou le marquage radioactif. Nous avons utilisé trois méthodes de purification. Il s'agit de la méthode enzymatique utilisée pour purifier un fragment d'acide nucléique directement du gel d'agarose. Les méthodes de précipitation différentielle et de chromatographie d'affinité ont été utilisées lors de la purification d'un fragment d'acides nucléiques, singulièrement amplifié, en solution.

##### **I - 4 - 1 - La méthode de purification enzymatique**

Cette méthode a été utilisée pour isoler, d'un ensemble de fragments d'acides nucléiques, le fragment d'intérêt de taille connue. Les différents ADNc amplifiés sont séparés par électrophorèse en conditions non dénaturantes sur un gel d'agarose « LMP » à 2 %.

La bande d'agarose contenant le fragment d'ADNc de taille adéquate est découpée et fondue par chauffage à 70 °C. L'agarose fondu est ensuite dépolymérisé au moins pendant 30 min à 45°C par traitement à l'agarase de type AgarACE™ (Promega), à raison de 2 U d'enzyme pour 200 mg d'agarose 2 %. Après une extraction au phénol/chloroforme (v/v) pour éliminer l'enzyme, les fragments d'ADN sont précipités durant une nuit par adjonction de 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 et de 2,5 volumes d'éthanol pur à température ambiante de façon à ne pas co-précipiter l'agarose. Le culot d'acides nucléiques est précipité par centrifugation pendant 15 min à 13.000 g. Après deux rinçages dans 200 µl d'éthanol à 75 % à température ambiante, le culot d'acides nucléiques est séché et repris dans de l'eau distillée et autoclavée, puis conservé à -20°C pour une utilisation ultérieure.

##### **I - 4 - 2 - La méthode de purification par précipitation différentielle**

Après amplification, 0,1 volume de STE (sodium tris EDTA) 10X (NaCl 1 M, Tris 0,5 M, EDTA 10mM, pH 8), 1 volume d'acétate d'ammonium 4 M et 2,5 volumes d'éthanol pur à température ambiante sont ajoutés au milieu réactionnel. Le culot d'acides nucléiques est obtenu par centrifugation pendant 15 min à 13.000 g. Dans de telles conditions, les fragments d'ADNc sont majoritairement précipités au détriment des amorces de taille beaucoup plus petite. Le culot de fragments d'acides nucléiques est rincé deux fois à température ambiante dans 200 µl d'éthanol à 75 %, puis séché et repris dans 1/8 volume

l'eau distillée et autoclavée. L'extrait d'ADNc ainsi purifié est conservé à -20°C pour une utilisation ultérieure.

### **I - 4 - 3 - La méthode de purification par chromatographie d'affinité**

La chromatographie d'affinité est le principe de base du kit « Wizard® DNA Clean-Up System » de chez Promega, kit que nous avons utilisé pour purifier majoritairement un fragment d'ADNc singulièrement synthétisé *in vitro*. L'extrait PCR contenant l'ADNc à purifier est mélangé à de la résine. Cette dernière va piéger le fragment d'ADNc à purifier. L'ensemble est introduit dans une micro colonne au moyen d'une seringue. Après élimination du milieu rationnel, la colonne de résine est lavée dans de l'isopropanol à 80 % et séchée. Les fragments d'ADNc sont ensuite élués dans de l'eau distillée, autoclavée et préalablement chauffée à 65-70°C. L'extrait d'ADNc ainsi purifié est conservé à -20°C pour une utilisation ultérieure.

### **I - 5 - Clonage et sous-clonage des fragments d'ADNc**

#### **I - 5 - 1 - Le clonage des fragments d'ADNc**

Le clonage est la technique utilisée pour insérer un fragment d'ADNc dans un vecteur, le rendant ainsi plus facile d'utilisation. Le vecteur est un plasmide modifié dans lequel ont été insérés un gène de résistance aux antibiotiques (l'ampicilline dans cette étude) et le gène Lac Z codant pour la  $\beta$ -galactosidase. Ce plasmide contient une succession de sites de restrictions différents et uniques d'endonucléases. C'est le site de clonage. Le principe du clonage consiste, dans un premier temps, à digérer le vecteur au moyen d'une d'endonucléase. Le fragment d'ADNc à cloner est ensuite inséré dans le vecteur par ligation enzymatique, bout à bout, au moyen d'une ligase. Le vecteur ayant inséré l'ADNc (ou insert) est dit recombiné. L'insertion du fragment d'ADNc peut être orientée ou non. Lorsque le gène Lac Z est induit par l'isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG), il produit une protéine de fusion comprenant la  $\beta$ -galactosidase et le produit de l'ADNc cloné. L'activité  $\beta$ -galactosidasique est détectée en présence de son substrat, le 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-GAL) dont le produit de dégradation donne une coloration bleue. En général, lorsque le clonage est réussi, l'insertion de l'ADNc change le cadre de lecture du gène Lac Z, provoquant la perte de l'activité  $\beta$ -galactosidasique de la protéine de fusion. On

peut ainsi différencier les vecteurs recombinés, ayant intégré un ADNc, des non recombinés qui n'en contiennent pas : c'est la sélection « bleu/blanc ».

Au cours de nos travaux, nous avons utilisé deux kits de clonage, « PCR-Script™ Amp » de chez Stratagène (Ozyme, St-Quentin-en-Yvelines, France), et « pGEM-T® easy Vector system II » de chez Promega, suivant les protocoles décrits et fournis par les fabricants respectifs. L'ensemble des réactifs nécessaires au clonage (vecteurs plasmidiques, enzymes et solutions tampon) sont fournis dans chaque kit. Ces deux kits permettent de cloner les fragments d'ADNc aux extrémités cohésives pour « pGEM-T® easy Vector system II », et franches pour « PCR-Script™ Amp ». Les différentes enzymes ADN polymérase utilisées pour amplifier les acides nucléiques *in vitro*, génèrent majoritairement des fragments à extrémités cohésives. De ce fait, l'avantage du vecteur pGEM-T® est de permettre un clonage direct à la fin de l'étape d'amplification et de purification de l'ADNc. A l'inverse, le clonage de fragments à bouts francs dans le vecteur PCR-Script™ nécessite au préalable une étape de synthèse terminale du fragment d'ADNc à cloner. Cependant, le vecteur de ce kit a l'avantage de disposer comme site de clonage d'un site de restriction d'une endonucléase (*Srf I*) très rare. De ce fait, l'adjonction de l'enzyme *Srf I* dans l'étape de ligation, évite la ligation du vecteur sur lui-même, ce qui permet d'accroître l'efficacité du clonage.

#### I - 5 - 2 - Le sous-clonage des fragments d'ADNc : l'excision *in vivo* de phage

Le sous-clonage est la technique qui consiste à transférer un insert entre vecteurs. Nous l'avons utilisé pour transférer les inserts d'un vecteur (le vecteur  $\lambda$  dans cette étude), dont la grande taille limite sa manipulation, vers un plasmide (pBS-SK<sup>-</sup> dans cette étude) plus facile d'utilisation. Pour ce faire, nous avons utilisé la méthode d'excision *in vivo*. Dans ce cas de figure, l'insert est déjà cloné dans un plasmide présentant toutes les caractéristiques communes aux plasmides (gènes de résistance aux antibiotiques, gène Lac Z). On dit de lui qu'il est autonome. Dans la méthode d'excision, le plasmide autonome est « extrait » du vecteur  $\lambda$ , puis circularisé par ligation enzymatique de ses extrémités. Dans cette étude, nous avons utilisé, lors du criblage de banque, le protocole d'excision adapté au phage  $\lambda$ . Le détail de ce protocole est décrit en annexe 6.

### I - 5 - 3 - Transformation bactérienne

Pour pouvoir mieux conserver et surtout multiplier aisément le vecteur récombiné, ce dernier est inséré dans une bactérie, c'est la transformation. Nous avons utilisé la méthode de transformation par choc thermique. Dans cette étude, trois types de bactéries *E. coli* thermo-compétantes ont été utilisés à cette fin. Il s'agit des *JM109* (Promega), des *XL10-Gold™* (Stratagène) et des *SOL R* (Stratagène) transformées respectivement avec les vecteurs pGEM-T, PCR-Script™ et pBS-SK<sup>-</sup>. Les protocoles utilisés pour transformer chaque type de bactérie sont ceux décrits et fournis par les fabricants respectifs.

Le plasmide récombiné, une fois transféré dans la bactérie, lui confère la résistance à l'ampicilline mais pas une activité  $\beta$ -galactosidasique. Sur la base des ces deux paramètres, les bactéries transformées (ampicilline résistant) et « positives » (colonies blanches) sont sélectionnées. Pour ce faire, la suspension bactérienne est mise en culture par étalement sur un milieu Luria Bertani (LB) agar 3,2 % (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), supplémenté en ampicilline à 60  $\mu$ M, en X-GAL à 40 mg/ml et en IPTG à 100 mg/ml

### I - 5 - 4 - Analyse des clones bactériens transformés et positifs

Cette analyse est effectuée dans le but de vérifier la qualité du clonage. Le clone bactérien transformé et « positif » est mis en culture pendant une nuit, sous agitation à 37°C, dans 1,5 ml de milieu LB liquide (Sigma) supplémenté en ampicilline. Le plasmide recombiné est extrait par lyse alcaline comme décrit précédemment. La présence de l'insert dans les vecteurs utilisés dans cette étude est détectée suivant l'une ou l'autre des techniques suivantes :

#### ⇒ Détection de l'insert par amplification *in vitro* du site de clonage

La détection de l'insert par PCR consiste à amplifier *in vitro* la région du plasmide contenant le site de clonage. Pour ce faire, nous avons utilisé l'ADN polymérase *AmpliTaq* et les amorces universelles sens « UF » et antisens « UR » dont les séquences complémentaires bordent le site de clonage. Le milieu réactionnel ainsi que les conditions PCR sont ceux décrits dans le tableau 3, exceptée l'hybridation qui est faite à 55°C pendant 1 min. Les produits PCR sont analysés par électrophorèse en conditions non dénaturantes sur un gel d'agarose 1 % dans les conditions identiques à celles décrites précédemment. Le «  $\lambda$  DNA EcoR I/Hind III Markers » est utilisé comme marqueur de masse moléculaire. L'amplification d'un clone faux « positif » avec les amorces « UF » et « UR » génère un fragment d'environ 100 pb alors que pour un vrai « positif », le fragment généré est plus grand.

⇒ Détection de l'insert par digestion du plasmide

Environ 1 µg d'ADN plasmidique est digéré pendant 3 heures à 37 °C, par des endonucléases (5 U de chaque). Pour chacun des vecteurs utilisés dans cette étude, les endonucléases sont choisies de manière à ce que les sites de coupure correspondants soient situés de part et d'autre du site de clonage. En plus du plasmide et de l'enzyme, le milieu réactionnel contient la solution tampon adéquate correspondant à l'enzyme, 0,1mg/ml de sérumalbumine bovine (BSA) et 0,5 mg/ml de RNase. La BSA ajoutée en excès protège l'enzyme contre d'éventuelles protéases contaminantes. Les produits de la digestion sont analysés par électrophorèse en conditions non dénaturantes sur un gel à 1 % d'agarose dans les conditions identiques à celle décrites précédemment. Le kit « λ DNA *EcoR I/Hind III* Markers » est utilisé comme marqueur de masses moléculaires.

### **I - 6 - Hybridation moléculaire des acides nucléiques**

La technique d'hybridation moléculaire est basée sur la spécificité avec laquelle les molécules d'acides nucléiques forment des duplex stables. Cette formation dépend du degré de complémentarité des brins d'acides nucléiques, et des conditions physiques (ou stringence) dans lesquelles s'opère l'hybridation. La stringence, ou pouvoir dissociant, est proportionnelle à la température et à la concentration en formamide, et inversement proportionnelle à la concentration en sels du milieu d'hybridation. Dans les conditions de forte stringence, la sonde ne s'apparie qu'à la séquence qui lui est parfaitement complémentaire alors que des appariements non-spécifiques sont tolérés en condition de faible stringence.

Dans cette étude, nous avons hybridé les ARN totaux et l'ADN (Southern, 1975) transférés et fixés sur un support solide. Celui-ci est constitué d'une membrane de nylon positivement chargée de chez « Schleicher et Schuell » (Cera labo, Ecquevilly, France). Nous avons utilisé le protocole standard d'hybridation décrit par Grosset *et al.* (1990).

#### **I - 6 - 1 - Séparation et transfert des ARN totaux sur membrane**

Les ARN totaux sont séparés par électrophorèse en conditions dénaturantes sur 400 ml d'un gel d'agarose à 0,8 %. Pour ce faire, les conditions décrites précédemment ont été légèrement modifiées comme suit : environ 15 µg d'ARN totaux sont utilisés par échantillon, et l'électrophorèse est faite sous une tension de 100 V, pendant environ 3 heures. Les ARN sont ensuite colorés pendant 10 min dans la solution tampon de coloration (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,9 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6,1 mM) supplémentée en acrydine orange à environ 10 µg/ml. Avant visualisation

sous U.V., l'excédent de coloration est éliminé par des lavages successifs dans la solution tampon de coloration. Le kit « RNA Markers » (Promega) est utilisé comme marqueur de masses moléculaires. Il est composé de 9 fragments d'acides nucléiques simple brin de taille comprise entre 281 pb et 6,5 k pb.

Le transfert des ARN s'effectue par capillarité dans la solution tampon de transfert SSC (sodium sodium citrate) 20 X autoclavée (SSC 20 X : NaCl 3 M, Na<sub>3</sub> citrate 0,3 M pH 7,0 ajusté avec NaOH 10 N), pendant une nuit (environ 16 heures). Les ARN sont fixés au support par covalence, après 2 heures de chauffage à 80 °C, et un traitement aux rayons ultra violets (U.V.) (deux fois à 0,16 J.cm<sup>-2</sup>). Afin d'évaluer la qualité du transfert, le gel d'agarose est coloré au bromure d'éthidium (BET) et visualisé sous U.V..

#### I - 6 - 2 - Digestion, séparation et transfert des fragments ADN sur membrane

##### ⇒ La digestion et séparation des fragments d'ADN

La digestion de l'ADN plasmidique et la séparation des produits de digestion par électrophorèse sont effectuées dans les conditions identiques à celles décrites précédemment. Il en est de même pour l'ADN génomique, excepté qu'ici environ 15 µg d'ADN génomique sont digérés pendant une nuit et que l'électrophorèse est faite sur un gel d'agarose à 0,8 %, sous une tension de 32 V, et dure une nuit. Le kit de type « λ DNA Hind III Markers » est utilisé comme marqueur de masses moléculaires. Les enzymes de restriction utilisées sont choisies en fonction du gène à étudier.

##### ⇒ Transferts des fragments d'ADN sur membrane

Cette méthode de transfert a été utilisée, aussi bien pour le transfert des inserts ADNc issus de la digestion des plasmides, que pour celui des fragments d'ADN génomique.

Au terme de l'électrophorèse, les fragments d'ADN sont dépurinés pendant 1 heure dans HCl 0,25 N, puis dénaturés pendant 1 heure dans NaOH 0,4 N. Les fragments d'ADN sont ensuite transférés par capillarité pendant une nuit (environ 16 heures). La solution tampon de transfert est une solution fraîche de NaOH 0,4 N. La membrane est ensuite traitée dans les conditions identiques à celles décrites pour le transfert des ARN.

I - 6 - 3 - Préhybridation, hybridation et lavages des membranes

⇒ Préhybridation

Le préhybridation est effectuée par une incubation de la membrane sous agitation à 40 °C, pendant au moins 2 heures, dans la solution de préhybridation composée formamide à 40 %, de sodium sodium citrate (SSC) 5X (solution mère SSC 20X : NaCl 3 M, Na<sub>3</sub> citrate 0,3 M pH 7,0), de Denhardt's 2X [BSA 0,04 %, ficol 0,04 %, PVP 4.000 0,04 %], SDS 0,5 % et 100 µg/ml d'ADN de sperme de Hareng préalablement dénaturé pendant 5 min à 100°C. Cette faible condition de stringence va permettre une fixation de l'ADN hétérologue de sperme de Hareng et des protéines contenues dans la solution de préhybridation.

⇒ Obtention et marquage de la sonde froide

La sonde froide est le fragment d'ADN utilisé pour hybrider les acides nucléiques transférés sur membrane. Elle est obtenue par digestion du plasmide ou amplification d'ADN *in vitro* comme décrit précédemment dans le paragraphe « Analyse des clones bactériens transformés et positifs ». Après digestion du plasmide, les produits de digestion sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose « LMP » 2 % dont la faible température de fusion est compatible avec l'activité maximale de l'enzyme utilisée lors du marquage radioactif. La bande d'agarose contenant la sonde est découpée puis fondue à 65°C, et directement utilisée pour le marquage radioactif. La quantité de plasmide digérée est telle qu'au moins 35 ng de sonde puissent être obtenus par µl de milieu réactionnel. La sonde froide synthétisée par amplification *in vitro* d'ADN est purifiée par précipitation différentielle, et environ 500 ng sont utilisés pour le marquage.

La sonde est marquée radioactivement au  $\alpha^{32}\text{PdCTP}$  selon la méthode de « Random prime labelling » décrite par Feinberg et Volgelstein (1983). Cette méthode est basée sur la technique de synthèse d'ADN *in vitro* au cours de laquelle le  $\alpha^{32}\text{PdCTP}$  est incorporé dans le brin néo-synthétisé. La réaction est catalysée par l'ADN polymérase I d'*E. coli*, « le fragment de Klenow », à partir des amorces aléatoires de 6 pb. Nous avons utilisé le kit « Ready to Go » (Pharmacia Biotech, Orsay, France) suivant le protocole décrit par le fabricant et légèrement modifié comme suit. Au terme de la synthèse, l'ADNc marqué est précipité pendant 30 min dans la glace. Pour ce faire, 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 et 2,5 volumes d'éthanol pur sont ajoutés au milieu réactionnel. Etant donnée la faible quantité d'ADNc marqué à précipiter, un supplément d'ADN de sperme de Hareng (environ 50 mg), dit «ADN carrier», est ajouté pour faciliter la précipitation. Après deux rinçages dans de l'éthanol froid à 70 %, la sonde marquée est reprise dans 200 µl d'eau autoclavée et conservée à -20°C.

⇒ Hybridation et lavages

L'hybridation est également réalisée dans de faibles conditions de stringence. Pour ce faire, la membrane est incubée dans la solution d'hybridation pendant une nuit à 40 °C. La solution d'hybridation est composée d'une solution de préhybridation fraîche supplémentée avec de la sonde marquée radioactivement et spécifique du gène d'intérêt. La sonde va se fixer sur la séquence d'acides nucléiques qui lui est complémentaire, ceci en déplaçant l'ADN hétérologue de sperme de Hareng.

Le lavage des membranes permet d'éliminer l'excédent de radioactivité ainsi que les hybridations aspécifiques. Pour ce faire, les membranes sont lavées dans les conditions de stringence de plus en plus élevée. La solution de lavage est composée de sodium sodium citrate (SSC) et du sodium dodécyl sulfate (SDS). Les proportions de SSC et de SDS, ainsi que les niveaux de stringence correspondants, sont représentés dans le tableau 4.

**I - 7 - Construction et criblage d'une banque d'ADN complémentaires**

Le criblage de banque fait appel à des techniques de synthèse d'ADN *in vitro*, de clonage (construction de banque et détermination de la taille moyenne des inserts ADNc), et d'hybridation moléculaire (criblage).

**I - 7 - 1 - Construction de la banque d'ADN complémentaires**

La banque d'ADNc est construite à l'aide du kit « Zap-cDNA synthesis<sup>®</sup> Kit » de Stratagène (Saint-Quentin en Yvelines, France) selon le protocole décrit par le fabricant.

Les ADNcs totaux double brin sont synthétisés à partir de 5 µg d'ARN messagers au moyen d'une transcriptase inverse et d'une ADN polymérase. Ces ADNc sont ensuite clonés de manière unidirectionnelle dans le vecteur UNIZAP-XR. Ce vecteur est l'ADN de bactériophage modifié dans lequel a été inséré un plasmide pBS-SK<sup>-</sup> autonome de 3 kpb, contenant les sites de clonage *EcoRI* et *XhoI*.

Le vecteur UNIZAP-XR est incubé en présence des protéines de la capsid et des pieds du bactériophage λ. Ce dernier se reconstitue, et devient ainsi infectant. Pour nos travaux, trois banques d'ADNcs ont été construites à partir des ARN messagers extraits du fruit vert, mi-mûr et sur-mûr. Les banques ont un titre de l'ordre de 10<sup>6</sup> phages recombinés par µg de vecteur, avec des inserts d'une taille moyenne déterminée par PCR, de 1,200 pb.



Stringence	Concentrations		Températures	
	SSC et SDS	% Formamide	Hybridation	Lavages
Très Forte	0,05X et 5%	75		75
Forte	0,5X et 0,5%	-		50
		-		45
		-		40
Moyenne	1X et 1%	-		50
		-		45
		-		40
Faible	2X et 1%	-		50
		-	40	45
		-		40

**Tableau 4 :** Relations entre le degré de stringence et les conditions physiques d'hybridation et de lavages.

Toutes les hybridations faites dans cette étude l'ont été avec des sondes homologues. Le sel est fourni sous forme de sel de sodium, sodium citrate ou SSC (solution mère SSC 20X : NaCl 3 M, Na<sub>3</sub> citrate 0,3 M pH 7,0 ajusté avec du NaOH 10 N, autoclavé). Le SDS (sodium dodécyl sulfate) est utilisé pour réduire le bruit de fond. L'intensité de ce dernier est d'autant plus importante que la concentration en SDS est basse.

### I - 7 - 2 - Criblage de la banque d'ADN complémentaires

Le protocole de criblage de banque utilisé dans cette étude est celui décrit par le fabricant et détaillé en annexe 7 (Stratagene),

Sur une boîte de pétri, les phages (environ  $3,5 \cdot 10^5$ ) sont multipliés sur un tapis bactérien de manière à obtenir des plages de lyse individuelles et bien séparées. L'ADN de phage est ensuite transféré par capillarité sur une membrane de nylon chargée positivement de façon à créer une réplique de la boîte de culture. L'ADN de phage ainsi transféré est dénaturé en maintenant pendant 7 min dans la solution de dénaturation (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH), puis neutralisé, pendant deux fois 3 min, dans la solution de neutralisation (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,2). Enfin, après un lavage dans 20 ml de SSC 2X, l'ADN de

phage est immobilisé sur la membrane par chauffage et traitement aux U.V. comme décrit précédemment pour le transfert des ARN. La membrane est ensuite préhybridée, hybridée et lavée dans des conditions identiques à celles décrites précédemment.

Pour chaque boîte de Pétri, deux membranes sont préparées, et plusieurs séries de criblages sont effectuées de façon à distinguer les vrais positifs (présents sur les deux membranes et à toutes les séries de criblage) des faux positifs (présents sur une seule des deux membranes).

Les clones positifs sont prélevés et transférés dans deux tubes Eppendorf de 0,5 ml contenant respectivement 100 µl de TE (Tris EDTA) 1X (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8), et 500 µl de solution tampon SM (sodium magnésium) (NaCl 0,25 M, MgSO<sub>4</sub> 8 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, gélatine 0,01 %) à 4 % de chloroforme pour une future caractérisation. L'ensemble est mélangé vivement, et laissé pendant 1 à 2 heures à température ambiante ou une nuit à 4 °C pour permettre la diffusion des phages.

La grande taille du vecteur UNIXAP-XR ne facilitant pas sa manipulation, l'insert correspondant est sous cloné. Pour ce faire, les plasmides pBS-SK<sup>-</sup> des phages repris dans la solution tampon SM à 4 % sont excisés suivant le protocole décrit en annexe. Le plasmide recombiné et autonome obtenu est recircularisé et introduit dans la bactérie *E. coli* SOLR par transformation.

### I - 7 - 3 - Détermination de la taille de l'insert du clone isolé

La détermination de la taille de l'insert est faite par PCR avec les amorces « UF » et « UR », à partir de 2 µl de la suspension de phage repris dans du TE 1X. L'ADN polymérase de type *Tfl* a été utilisée dans le milieu réactionnel. Les conditions standards de PCR sont décrites dans le tableau 3. Les produits d'amplification sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 % en conditions non dénaturantes.

## II - TRAITEMENT DE DONNEES : IDENTIFICATION D'UN GENE

### II - 1- Séquençage de gène

La détermination de la séquence d'un gène est la première étape de son identification. Les clones d'intérêt sont transmis, sous forme de plasmide ou de suspension bactérienne dans 50 % de glycérol, chez Eurogentec (Seraing, Belgique) ou ESGS (Evry, France) pour séquençage.

## **II - 2- Analyse de la séquence du gène**

L'identification des gènes s'effectue sur ordinateur, par analyse des séquences nucléotidique et polypeptidique du gène correspondant. Les étapes de cette analyse ainsi que les logiciels utilisés à chacune d'elle sont les suivants :

- la séquence nucléotidique est comparée dans ses trois cadres de lecture par ordinateur à l'aide du programme BLAST (Altschul *et al.*, 1997). La comparaison est faite par rapport à la banque de données NCBI (National Center for Biotechnology Information, bibliothèque national de l'université de médecine, Bethesda, MD)

- la séquence nucléotidique est traduite à l'aide du logiciel «ESEE» (The Eyeball Sequence Editor, Version 1.0) (Cabot et Beckenbach, 1989). Ceci permet de déterminer la séquence d'acides aminés correspondante.

- les caractéristiques de la séquence d'acides aminés correspondant au gène (masse moléculaire, pI, motifs fonctionnels, site potentiels de glycosylation, etc...) sont ensuite déterminées à l'aide du logiciel GCG (Genetics Computer Group Université du Wisconsin) (Devereux *et al.*, 1984), ScanPROSITE (Hofmann *et al.*, 1999) ou SOSUI (Takatsugu *et al.*, 1998).

- si cette séquence d'acides aminés correspond à une protéine de fonction connue, les différentes séquences d'acides aminés sont alignées à l'aide du logiciel MultAlin de Corpet (1988), de manière à identifier les homologies de séquences.

- pour les ADNc complets, le peptide signal du polypeptide est identifié à l'aide du programme SignalP V1.1 (Nielsen *et al.*, 1997).

La recherche d'amorces spécifiques à partir des séquences nucléotidiques a été effectuée à l'aide du logiciel GCG.

## **III - METHODES RELATIVES AUX PROTEINES**

### **III -1- Extraction de protéines totales**

Les protéines totales du fruit sont extraites au phénol selon le protocole décrit par Lelièvre *et al.* (1995). Un gramme de poudre végétale est homogénéisé pendant 30 min à 4 °C dans un mélange comprenant 3 ml de phénol à pH 8 et 3 ml de solution tampon d'extraction (Tris-HCl 10 mM pH 8,  $\beta$ -mercaptoéthanol 10 % [v/v]). Après 15 min de centrifugation à 9.000 g, les protéines totales contenues dans la phase phénolique sont de nouveau extraites deux fois de suite dans les mêmes conditions. Les protéines sont précipitées durant une nuit à

- 20°C par ajout de 4 volumes d'une solution de méthanol / acétate d'ammonium 0,1 M. Le culot de protéines obtenu après centrifugation à 4 °C et 9.000 g pendant 8 min est lavé 6 fois dans la solution de précipitation, séché et conservé à - 20°C.

### **III - 2 - Dosage des protéines totales**

La quantité de protéines totales est évaluée selon la méthode de Bradford (1976) par dosage spectrophotométrique à 595 nm.

Une courbe étalon est réalisée à partir de plusieurs dilutions d'une solution mère de séralbumine bovine (2 mg/ml), préparées dans NaOH 0,1 N.

Le culot de protéines est repris dans NaOH (0,1 N de concentration finale) par chauffage pendant 3 min à 60 °C. Cette solution mère est diluée plusieurs fois. L'absorption du mélange réactif de Bradford/extrait protéique dilué (50/50) est mesurée à 595 nm.

### **III - 3 - Séparation des protéines totales par électrophorèse SDS-PAGE**

L'électrophorèse est réalisée selon Laemmli (1970) à l'aide de l'appareil « Mini-PROTEAN II Cell » (Bio-Rad, Ivry sur Seine, France).

Le support électrophorétique est constitué d'un gel de concentration à 5 % de polyacrylamide, pH 6,8 et d'un gel de séparation à 12 % de polyacrylamide, pH 8,8. La migration est effectuée sous une tension de 120 volts dans la solution tampon Tris 0,3 %, glycine 0,144 %, SDS 0,1 %.

Les protéines totales sont reprises dans une solution tampon (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 20 % [p/v] SDS, 10 % [v/v] glycérol, 2,5 % [v/v] phénol, 5 % [v/v] β-mercaptoethanol et 10 mM DTT) et chauffées 5 min à 100 °C pour faciliter leur dissolution. Le SDS contenu dans la solution tampon de reprise sature les protéines en charges négatives permettant ainsi leur séparation uniquement en fonction de leur masse moléculaire. Dix µg de protéines sont déposées par puits du gel pour l'électrophorèse.

Au terme de l'électrophorèse, les protéines sont colorées pendant 10 min à température ambiante dans une solution de bleu de Commassie 0,1 % (p/v) et décolorées dans 10 % (v/v) d'acide acétique. Le kit de protéines étalon de tailles comprises entre 97,4 et 14,5 kDa (Biorad) est utilisé comme marqueur de masses moléculaires.

### **III - 4 - Transfert des protéines totales sur membrane**

Sur deux gels à 12 % polyacrylamide, 10 µg de protéines totales sont séparées par électrophorèse SDS-PAGE comme décrit précédemment. Un gel est coloré au bleu de Commassie afin de vérifier qu'une quantité identique de protéines a bien été déposée d'une piste à l'autre. Le deuxième gel est utilisé pour le transfert des protéines.

Le transfert des protéines est réalisé par courant électrique dans « l'appareil Trans-Blot Cell » (Bio-Rad, France). Le transfert s'effectue sur une membrane de nitrocellulose (Hybond<sup>TM</sup>-Cpure, Amersham, Orsay, France) pendant 1 heure sous une tension de 100 volts, et dans la solution tampon de Towbin (192 mM glycine, 25 mM Tris, 20 % [v/v] méthanol) (Towbin *et al.*, 1979).

### **III - 5 - Détection immunochimique d'une protéine sur membrane**

La détection immunochimique de protéine sur membrane, à l'aide d'anticorps, est réalisée suivant le protocole décrit par Lelièvre *et al.* (1995). La méthode de détection immunochimique est basée sur le principe suivant : après la saturation des sites aspécifiques de la membrane, deux anticorps, primaire et secondaire, sont successivement utilisés. L'anticorps primaire va se fixer sur la protéine d'intérêt contre laquelle il est dirigé. Quant à l'anticorps secondaire, il est dirigé contre l'anticorps primaire et conjugué à une activité enzymatique. L'induction de cette activité enzymatique permettra de révéler la protéine d'intérêt.

Dans cette étude, les anticorps primaire et secondaire sont dilués respectivement 3.000 et 7.500 fois. Nous avons utilisé un anticorps primaire de lapin et un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin, conjugué à la phosphatase alcaline (Sigma).

## ***Résultats et Discussion***

## **Isolement des gènes exprimés dans le fruit**

Depuis que le changement d'expression génique a été identifié comme étant la base du processus de maturation des fruits climactériques, de nombreuses méthodes de biologie moléculaire telles que le criblage différentiel (Cochran *et al.*, 1987), la banque soustractive (Sive et St-John, 1988) ou la DDRT-PCR (Liang et Pardee, 1992) permettant d'isoler massivement les gènes en fonction de leur niveau d'expression ont été mises au point. Bien qu'étant très sensibles et efficaces, ces techniques sont en général coûteuses et techniquement « lourdes ». La technique de criblage différentielle a été envisagée au laboratoire. Trois banques d'ADNc spécifiques de trois stades de développement du fruit (vert immature, tournant et sur-mûr) ont été construites à cet effet mais celles-ci n'ont pas été exploitées compte tenu des priorités. Pour isoler un grand nombre de gènes d'abricot, nous avons opté pour une méthode basée sur le séquençage systématique de clones isolés de manière aléatoire d'une banque d'ADN complémentaires de fruit mûr. Cette méthode, beaucoup moins sensible mais simple d'utilisation, nous a cependant permis d'isoler un grand nombre de gènes. Trois d'entre eux, entrent dans le cadre des objectifs de cette thèse compte tenu des métabolismes potentiels dans lesquels ils sont impliqués. Il s'agit du gène de l'expansine impliquée dans le métabolisme des parois, de la zéaxanthine époxydase impliquée dans le métabolisme des xanthophylles et le gène *p69RF* homologue à la protéine E8 dont le rôle dans l'autoinhibition de la biosynthèse de l'éthylène a été démontré chez la tomate.

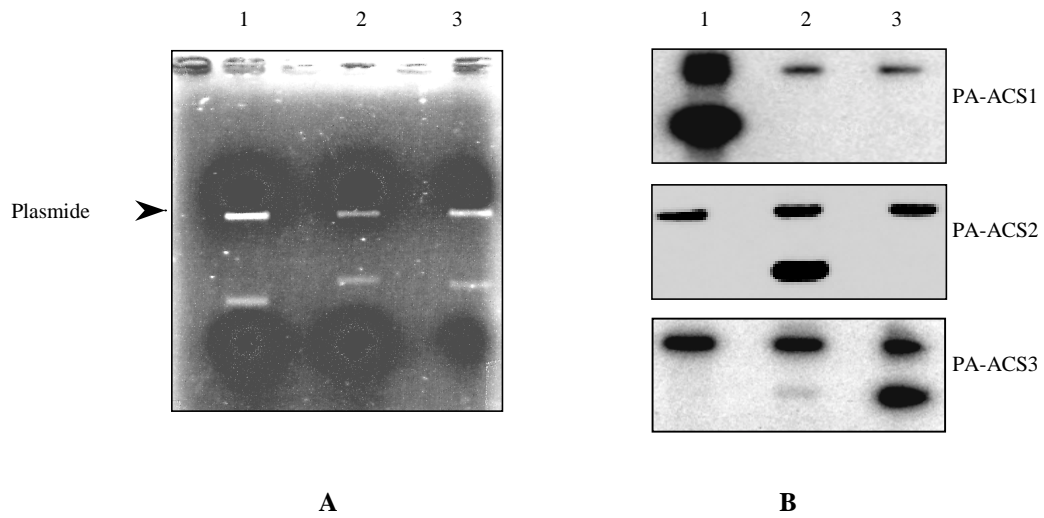
Dans une approche plus ciblée menée conjointement, nous avons isolé par RT-PCR 3 gènes incomplets d'ACC synthase *PA-ACS1*, *PA-ACS2* et *PA-ACS3* et un gène complet d'ACC oxydase *PA-ACO*, les enzymes clés de la voie de biosynthèse de l'éthylène. Deux gènes incomplets codant pour la pectinéméthylestérase et  $\beta$ -galactosidase, enzymes potentiellement impliqués dans la perte de fermeté ont également été isolés par RT et RACE-PCR.

Au total 45 gènes ont été isolés du fruit d'abricot et leur séquence respective enregistrée dans la banque de données GenBank (voir annexe 8). Nous ne décrivons ici que les séquences des gènes plus en rapport avec les objectifs de la thèse.

	<i>PA-ACSI</i>	<i>PA-ACS2</i>	<i>PA-ACS3</i>
<i>PA-ACSI</i>	-	38,9 (30,4)	43,5 (30,2)
<i>PA-ACS2</i>	54,9 (41,6)	-	61 (56,8)
<i>PA-ACS3</i>	59,6 (43,5)	58,9 (53,9)	-

**Tableau 5 :** Pourcentage d'identité nucléotidique et d'acides aminés (entre parenthèses) entre les fragments cDNAs *PA-ACSI*, *PA-ACS2* et *PA-ACS3* isolés chez l'abricot.

Les séquences nucléotidiques et d'acides aminés des différents clones ont été alignés avec le programme MultAlin (Corpet, 1988). Le pourcentage d'identité représente le rapport entre le nombre d'acides nucléiques (acides aminés) identiques entre deux clones et le nombre d'acides nucléiques (acides aminés) de la séquence de chacun.



**Figure 10 :** Spécificité génique entre les gènes *PA-ACSI*, *PA-ACS2* et *PA-ACS3* d'abricot.

Deux cent nanogrammes de plasmide contenant les gènes *PA-ACSI* (piste1), *PA-ACS2* (piste2), *PA-ACS3* (piste3) ont été digérés et séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose 1% (A). Les membranes ont été successivement hybridées avec les gènes *PA-ACSI*, *PA-ACS2* et *PA-ACS3* marqués radioactivement (B).



# I - LES GENES IMPLIQUES DANS LA BIOSYNTHESE DE L'ETHYLENE

## I - 1 - Les gènes d'ACC synthase d'abricot

Trois gènes d'ACC synthase, dont un fragment génomique (*PA-ACSI*) et deux ADNc (*PA-ACS2* et *PA-ACS3*), ont été isolés du fruit d'abricot. Pour ce faire, la technique d'amplification d'ADN *in vitro* a été utilisée à partir de 6 couples d'amorces dégénérées (tableau 2). Les amorces ACS-CS et ACS-HAS ont été définies dans cette étude et OLE-2, OLE-4, OLE-5 et OLE-6 décrites dans la littérature (Mason et Botella, 1997).

Le fragment génomique est synthétisé à partir de l'ADN, au moyen de l'ADN polymérase *Tfl*, dans son milieu réactionnel et des amorces dégénérées ACS-CS et ACS-HAS (tableau 2). Quarante cycles PCR ont été effectués dans les conditions standards décrites dans le tableau 3 exceptée l'hybridation qui a été faite à 55°C. L'unique fragment de 900 pb obtenu est purifié du gel d'agarose par la méthode enzymatique, ré-amplifié dans les conditions identiques, avant d'être cloné dans le vecteur PCR-Script™.

Deux fragments d'ADNc d'environ 1000 pb ont été obtenus par RT-PCR. Les ADNcs totaux sont synthétisés par transcriptase inverse à partir des ARN totaux de fruit sur-mûr (Sm). Les ADNcs sont amplifiés au moyen de l'ADN polymérase de type *Expand™ High Fidelity* dans le milieu réactionnel associé et à partir des amorces dégénérées OLE-2, OLE-4, OLE-5 et OLE-6 (tableau 2). Les conditions PCR utilisées sont celles décrites par Mason et Botella (1997). Purifiés par chromatographie d'affinité, les fragments d'ADNc synthétisés sont ensuite clonés dans le vecteur pGEM-T®.

Le fragment génomique, *PA-ACSI*, long de 894 pb contient un intron de 87 pb et code pour un polypeptide de 269 acides aminés (n° d'accion AF184076). Quant aux ADNc *PA-ACS2* (n° AF184077) et *PA-ACS3* (n° AF184078), ils ont une longueur respective de 1.164 et 1.104 pb correspondant respectivement à des protéines de 388 et 368 acides aminés. Les gènes *PA-ACSI*, *PA-ACS2* et *PA-ASC3* sont différents et codent pour trois isoformes d'ACC synthase. Les identités nucléotidiques entre *PA-ACSI*, *PA-ACS2* et *PA-ACS3*, calculées sur la totalité de leur séquence respective, sont comprises entre 38,9 et 61 % (tableau 5). *PA-ACS2* et *PA-ACS3* ont une identité plus forte entre eux qu'avec *PA-ACSI*. En effet, l'hybridation croisée entre les différents gènes montre que les trois sondes, *PA-ACSI*, 2 et 3, reconnaissent le plasmide, contrôle positif, indiquant qu'un dépôt de plasmide a été effectué sur toutes les pistes. *PA-ACSI* et *PA-ACS2* ne sont spécifiques qu'à eux-mêmes mais,

par contre, la sonde *PA-ACS3* reconnaît faiblement le gène *PA-ACS2* mais pas *PA-ACS1* (Fig. 10).

Les séquences d'acides aminés correspondant aux gènes *PA-ACS1*, *PA-ACS2* et *PA-ACS3* ont été alignées et comparées (Fig. 11). Elles contiennent toutes le site actif des enzymes ACC synthase, ainsi que les résidus acides aminés communs aux aminotransférases et aux enzymes à pyridoxal phosphate (Yip *et al.*, 1990 ; Rottmann *et al.*, 1991 ; Yang et Dong, 1993 ; Zarembinski et Theologis, 1994 ; Tarun et Theologis, 1998). Les pourcentages d'identité entre les polypeptides d'ACC synthase varie de 50 à 70 % d'une espèce à l'autre (Rottmann *et al.*, 1991). Le maximum d'identité en acides aminés observé est de 66 % entre la séquence du gène *PA-ACS1* et celle d'ACC synthase de riz (U35779), 79 % entre les séquences des gènes *PA-ACS2* et *pPPACS3* (n° d'accension AB15625) de poire (*Pyrus pyrifolia*) et 89 % entre les séquences des gènes *PA-ACS3* et *pPPACS2* (n° d'accension AB007639) de poire (*Pyrus pyrifolia*).

## **I - 2 - Le gène d'ACC oxydase d'abricot**

L'ADNc complet codant pour l'ACC oxydase a été isolé en criblant la banque d'ADN complémentaire construite à partir d'ARN messagers extraits de fruit sur mûr comme décrit dans le chapitre « Matériel et Méthodes ». Le fragment d'ADNc de 840 pb codant pour l'ACC oxydase d'abricot, isolé par RT-PCR (Mbéguié-A-Mbéguié, 1996), a été utilisé comme sonde pour cribler la banque d'ADNc de fruit sur mûr, et isoler le gène complet. Les membranes hybridées dans les conditions standards sont successivement lavées à faible stringence (voir tableau 4), pendant 40 min à 40°C et à 45°C.

Après trois séries de criblage, deux ADNc complets, identiques en séquence nucléotidique, ont été isolés. La séquence de l'ADNc appelée *PA-ACO* (n° d'accension AF026793) contient deux régions non codantes de respectivement 79 pb à l'extrémité 5' et 196 pb à l'extrémité 3'. La partie codante du gène, longue de 960 pb, correspond à une protéine de 360 acides aminés dont le masse moléculaire calculée est d'environ 37 kDa.

Les protéines d'ACC oxydase sont fortement conservées d'une espèce à l'autre (Kende, 1993). La séquence d'acides aminés correspondant au gène *PA-ACO* a été alignée avec les séquences d'ACC oxydase obtenues chez d'autres espèces végétales (Fig. 12). Par comparaison de séquence, *PA-ACO* présente une homologie de 86 à 92 % avec les protéines d'ACC oxydase d'autres espèces.

	10	20	30	40	50	
PA-ACS1						
PA-ACS2		<u>YFDGWKAYDR</u>	NPFHPTKNPE	GVIQMGLAEN	QLSFDLIEE.	.RIKKNPKAS
PA-ACS3				<u>.....</u>	.V....L.KY	LELE.HS.S.
		60	70	80	90	100
PA-ACS1						
PA-ACS2		ICTPEGVEEF	KNVAIFQDYH	GFPEFRKAVA	MFMSKARGGR	VTFDPNRVVM
PA-ACS3		NLGSK..SG.	.KN.L..N..	.LLS.K..M.	I..DQIK...	AK...D..FL
			+			
		110	120	130	140	150
PA-ACS1			D	AFLVPTPYYP	GLDKDIKWRT	GVEIITVPCR
PA-ACS2		SGGATGANEL	VMFCLADPG.	.....S....	AF.R.LG...	..Q.VP.D.H
PA-ACS3		TA...A....	LT.II.....	<u>.L.....</u>	.FD.NLR...	..N.VPIHTD
				*		
		160	170	180	190	200
PA-ACS1		SADKFNLSVT	ALDRAFNOAK	KRGLKVRGII	ISNPSNPVGT	LFSRESLYNL
PA-ACS2		.SNN.KITKE	..EA.YEK.Q	.NNI..K.L.	.T.....L..	TLD.DT.ES.
PA-ACS3		.SNN.QVTPQ	..EA.YKE.E	AKNM....VL	.T.....L.A	TIQ.QV.ERI
					** *	
		210	220	230	240	250
PA-ACS1		LDFAREKNIH	IISNELFAGS	THGSEEFVSM	ADIVELEDLD	QNRVHIVY <b>G</b>
PA-ACS2		VE.INQ....	LVCD.IY.AT	VFS.PT.TCI	SEVIQNMNC	NPNLI.... <b>S</b>
PA-ACS3		.G.VTQ....	LV.D.IYS..	AFS.SE.ISV	AEIL.SQQYK	NSE..... <b>S</b>
			* *			
		260	270	280	290	300
PA-ACS1		<b>LSKDL<b>S</b>LPG<b>F</b></b>	RAGVIYSFNK	NVLAAAKRLT	RFSSISTPSQ	QLLSSMLSDT
PA-ACS2		.... <b>MG</b> ... <b>L</b>	.V.IV..Y.D	D.VNIGRKMS	S.GLV.SQT.	HM.A...L.E
PA-ACS3		.... <b>G</b> ....	.V.TV..Y.D	K.VTTAR.MS	S.TLI.SQT.	H..A....K
		+	* *			
		310	320	330	340	350
PA-ACS1		KFVQKFIDAN	RERLRGMHLK	FLTGLKQLGI	ECTKSNNGGFS	CWADMSGLIR
PA-ACS2		E..AR.LETS	SK..ANR.GV	.TK..EEV..	N.L...A.LF	..MDLRR.LK
PA-ACS3		E.TENY.KT.	.....KRYDM	IIE...KA..	..LRG.A.LF	..MNL.P.LE
		360	370	380	390	
PA-ACS1		SYNEKGELEL	WDRLLNVAKV	NVTPGSSCHC	IEPGWFRVWF	
PA-ACS2		DQTFD..MV.	.RVIV.EVGL	..S...FK.	V.....CA	
PA-ACS3		KPTRG...A.	..SM.HEV.L	.IS.....	<u>S.....C..</u>	
				*		

**Figure 11 :** Alignement optimum des séquences d'acides aminés déduites des gènes PA-ACS1, PA-ASC2 et PA-ACS3 isolés chez l'abricot.

Les séquences ont été alignées à l'aide du programme Multalin (Corpet, 1988). Les points symbolisent les acides aminés identiques. Les espaces ont été introduits pour optimiser l'alignement. Les régions conservées ayant servi à définir les amorces dégénérées sont soulignées d'un trait. L'octapeptide correspondant au site actif des enzymes ACC synthase est indiquée en gras (Yip et al., 1990). Les résidus d'acides aminés conservés chez les enzymes appartenant à la famille des aspartates aminotransférase phosphate sont indiqués par une étoile ou une croix. Les résidus K<sub>253</sub>, R<sub>261</sub>, G<sub>263</sub> constituent le site de fixation du pérydoxal Phosphate (Rottmann et al, 1991). Les résidus tyrosine (Y<sub>69</sub>) et lysine (K<sub>253</sub>) indiqués par une croix jouent un rôle important dans le mécanisme catalytique (Tarun et Theologis, 1998).

	10	20	30	40	50	
Abricot		MENF <b>P</b> IINLE	GLNGEGRKAT	MEKIKD <b>A</b> CEN	WGFFELVSHG	IPTEFLDTVE
Pêche		.....	.....	.....	.....	.....
Geranium		..S..V..M.	K....E.A..	.....	.....LN..	..Y.L.....
Tomate		.....	N...DE.AK.	..M.....	.....N..	..H.VM....
Kiwi		..A..V.DM.	K....E.AP.	.....	.....N..	..SH.LM....
			60	70	80	90
Abricot		RLTKEHYRQC	LEQRFKELVA	SKGLEAVKTE	VNDMDWESTF	YLRHLPKSNI
Pêche		.....	.....	.....	.....	.....
Geranium		KM.....K.	M.....M..	.....G.EV.	.E.L.....	F.K...E...
Tomate		K...G..KK.	M.....	.....QA.	.T.L.....	F.....T...
Kiwi		.....NK.	M.....M..	T.....QS.	I..L.....	F.....V...
			110	120	130	140
Abricot		SEVPDLEDQY	RN VMKEFAL	KLEKLAEQLL	DLLENLGL	QGYLKAFYK
Pêche		.....	.....	.....	.....	.....
Geranium		.Q....Q.E.	.K.....A.	.....E...	..S.....K	.....
Tomate		.Q....DEE.	.E..RD..KR	.....E...	.....K	...N.....
Kiwi		..I....Q.H	.K A.....E	.....	.....V...	K.....
			160	170	180	190
Abricot		TNGPTFGTKV	SNYP <b>P</b> CNP <b>E</b> L	IKGLRA <b>H</b> TDA	GGLILLFQDD	KVSG <b>L</b> QLLK <b>D</b>
Pêche		.....	.....	.....	.....	.....
Geranium		SK.....	.....K.D.	.....	.....	.....
Tomate		SK..N.....	.....K.D	.....	..I.....	.....
Kiwi		SK.....	.....R.....	.....	..I.....N	.....
			210	220	230	240
Abricot		GQWIDVPPMR	HSIVIN <b>L</b> GDQ	LEVITNGKYK	SVEHRVIAQT	DG <b>T</b> RMSIASF
Pêche		.....	.....	.....	.....	.....
Geranium		.K.V....H	.....	.....	..I.....S	.....
Tomate		E.....	...V.....	.....	..M.....	...L...
Kiwi		.E.....K	.....I...	.....	..M.....P	..N.....
			160	170	180	190
Abricot		YNPGSDAVIY	PAPTLVEKEA	EEKNQVYPKF	VFEDYMKLYA	GLKFQ <b>P</b> KE <b>P</b> R
Pêche		.....	.....	.....	.....	.....
Geranium		.....	...A.L...T	.....	.....S	...A....
Tomate		...N.....	...S.I.	..SK.....	..D.....	.....
Kiwi		.....M.	...A..D..E	DQQ.....	.....	.....A...
			310	320	333	
Abricot		FEAMKAVETN	IS LGP	IAT A IS LGP	I ATA	
Pêche		.....	.....	.....	.....	
Geranium		.....A.	VT .D. .R.	.VT .D. .R..		
Tomate		.....M.A.	V E.VDQ..S	.V E.VDQ. .S.		
Kiwi		.....M.N	AV N.. .I	AV N... .I		

**Figure 12 :** Alignement optimum des séquences d'acides aminés déduites des gènes d'ACC oxydase isolés chez l'abricot (*PA-ACO*) et chez d'autres espèces végétales.

Les différentes séquences d'acides aminés ont été alignées à l'aide du program Multalin (Corpet, 1988). Elles correspondent aux gènes d'ACC oxydase d'abricot isolé dans cette étude (*PA-ACO* n° d'accension AF026793), de pêche (*PAO1* n° X77232), du géranium (*pGEFE-1* n° U07953), de tomate (*pTOM5* n° X58885) et de Kiwi (*ACTACCOX1* n° M97961 ). Les points correspondent aux acides aminés identiques. Les espaces ont été introduits pour optimiser l'alignement. Les douze résidus d'acides aminés conservés entre les différentes protéines ayant pour cofacteur l'ascorbate et le fer sont en gras. Le résidu arginine R<sub>300</sub> potentiellement impliqué dans la liaison carbamyl est en gras et double souligné.

**Résultats et Discussion - Isolement des gènes exprimés dans le fruit**

10	20	30	40	50	
p69RF	TNEVPSIAN	YDRKSEVKTF	DDTKEGVKGL	VDAGITKVPR	IFHLPVDQYP
2A6-1	MAG	...AG...A	.QM.I.....	.....	HQ
2A6-2	MES	S..S.QA.A	.E..T.....	.AS..KEI.A	M..T.P. T
E8-1	MIFQATIQNS	..KM.DLIA.	....A.....	..S..N...Q	V.I..P
E8-2	MESPRVEES	..KM..L.A.	....A.....	..S.....Q	..V..P
<b>Région I</b>					
	60	70	80	90	100
p69RF	INNTCDSEPT	KTQLRIPVID	LEGLEYDNSP	TKRKETVAKV	GEASETWGFF
2A6-1	DVAVTNPK.S	S...E..T..	VG.GVFESTV	...SVI...	RA.V.KF...
2A6-2	LTSLKQTA.P	SQ..T..TV.	.K.GSMD L	IS.RSV.E.I	.D.A.R....
E8-1	KYRVKTC	E.HISF....	.K. I.ED.	I.Y..I.D..	RD.....
E8-2	KDRAKCC	E.HFVF....	.Q. .ED.	I.H..I.D..	RD...K....
	110	120	130	140	150
p69RF	QIANHGIPVD	VLEEIKNGVR	GFFEQDTEVK	KKYYTRDRFR	PVIYNSNFDL
2A6-1	.VI.....L.	.M.SM.D.I.	..H...S...	.TF.S..ITK	K.K..T....
2A6-2	.VV....S.E	.M.RM.E.I.	R.H...P...	.RF.S..HT.	D.L.Y..I..
E8-1	.VV.....TS	I..KTLL.T.	Q.....I.	Q.....IGE	K...TS.L..
E8-2	.VV.....TS	..DRTLQ.T.	Q.....N...	Q.....TAK	K.V.T..L..
<b>Région II</b>					
	160	170	180	190	200
p69RF	YS A PATNW	RDTFLCNMAP	NPPKPEDLPQ	VCRDILVEYS	KQVMKLGKLL
2A6-1	.. S Q.A.	...LTMV...	DV.QAG...V	I..E.ML...	.RM...E.I
2A6-2	HT CNK.A.	...LA.Y...	D...LQ...A	..GE.MM...	..L.T..EF.
E8-1	..PSV..AS.	..SIFFF...	..PS.QEF.T	A.GE..MD..	.Y.TE..FS.
E8-2	.KSSV..AS.	...IF.Y...	...SLQEF.T	P.GES.IDF.	.D.K...FT.
<b>Région III</b>					
	210	220	230	240	250
p69RF	FELLSEALGL	KPSHLNDMDC	SLGLQILGHY	YPPCPQPELT	LGTSKHADND
2A6-1	.....	..N..KELN.	AKS.SL.S..	....E.DR.	F.I.S.T.IS
2A6-2	.....	N.N..K..G.	AKSHIMFGQ.	.....D..	..I...T.FS
E8-1	L.....G...	DR.Y.K.YMD	YCHQSC.C..	..S.....	M.I.Q.S.TE
E8-2	L.....G...	DR.Y.K.YMD	CFH.FCSCN.	.....	M..IQ.T.IG
<b>Région III</b>					
	260	270	280	290	300
p69RF	FITVLLQDHI	GGLQVLHQNT	WIDVLPVPGA	LVVNIGDLLQ	LISNDRFRSV
2A6-1	...I.....	.....DGY	....P.N.E.	.I..L.....	..T..K.V..
2A6-2	...I...N.	.....I.DQC	.V..S.....	..I.....	.....K.I.A
E8-1	.....D.	.....Q	.F..P.IR..	.....F..	.M...KYM..
E8-2	.V.I...DM	.....H	.V..P.T..S	.....F..	.L...KYL..
	310	320	330	340	350
p69RF	<b>E</b> HRVLANRAC	PRVSVACFF	STGFLALPRI	YGPIKELLSE	DNLPKYRETT
2A6-1	.....GE	E..I.S.S..	MHT.IPNEQV	...M....K	Q.P....N..
2A6-2	...I..GSS	E..I.MP..V	..FMKPNPRI	.....	Q.PA...DL.
E8-1	..AI.KKDG	S.M.....	GENP.QSSKL	.E..T....	..P...HA..
E8-2	..AIS.NVG	S.M.IT...	GESPYQSSKL	...T....	..P...A..
	360	374			
p69RF	VKDYNAAHHYN	KGLDGTALCALT	HFKL		
2A6-1	TTEMAR.YLA	R.....SP.L	..RI		
2A6-2	ITEFSNTFRS	QTISHP	..H..RI		
TomateE8-1	.I..KNYVL.	.....S..L	SY.I		
TomateE8-2	...HTSYLH.	R.....S..S	RY.I		

**Figure 13 :** Alignement optimum des séquences d'acides aminés déduites des gènes p69RF, 2A6, et E8 isolés respectivement chez l'abricot, *Arabidopsis thaliana* et la tomate.

Les séquences d'acides aminés correspondant aux gènes d'abricot (gène p69RF, n° d'accension AF139500), d'*Arabidopsis thaliana* (2A6-1 n° AC004669 ; 2A6-2, n° X83096) et de tomate (E8-1 n° AF004917 ; E8-2 n° X13437) ont été alignés à l'aide du programme Multalin (Corpet, 1988). Les points symbolisent les acides aminés identiques. Les espaces ont été introduits pour optimiser l'alignement. Les 3 régions communes aux dixogénases de types 2-oxaloglutarate dépendant sont surlignées. La région II est potentiellement impliquée dans la formation de la structure en hélice via ses résidus leucine conservés et indiqués ici en gras (Trentmann et Kende, 1995 ; Prescott et John, 1996). Les résidus cystéine et histidine conservés de la région III (en gras et double soulignés) seraient impliqués dans la fixation du fer.

L'ACC oxydase fait partie de la famille des enzymes qui utilisent comme cofacteurs le fer, l'ascorbate et le CO<sub>2</sub> (Bouzayen *et al.*, 1991 ; Poneleit et Dilley, 1993 ; Flühr et Mattoo, 1996). Les douze résidus d'acides aminés du polypeptide PA-ACO (P<sub>5</sub>, A<sub>27</sub>, G<sub>32</sub>, H<sub>39</sub>, H<sub>177</sub>, D<sub>179</sub>, L<sub>195</sub>, Q<sub>196</sub>, G<sub>218</sub>, H<sub>234</sub>, R<sub>244</sub>, S<sub>246</sub>) sont également conservés chez les enzymes à activité « fer- et ascorbate-dépendant » (Tang *et al.*, 1993). Les résidus H<sub>177</sub>, D<sub>179</sub>, H<sub>211</sub>, H<sub>234</sub>, serviraient de sites de fixation du fer (Shaw *et al.*, 1996 ; Tayed *et al.*, 1999). Dans le mécanisme réactionnel, le CO<sub>2</sub> se fixe sur l'ACC oxydase via une liaison carbamate (Poneleit et Dilley, 1993) et d'après Lay *et al.*, (1996), cette fixation se ferait au niveau du résidu arginine R<sub>300</sub>.

Trois sites d'activité ACC oxydase ont été identifiés dans les cellules végétales. Indépendamment du tissu et de l'espèce, il s'agit des vacuoles, de l'apoplasme et du cytoplasme (Guy et Kende, 1984 ; Porter *et al.*, 1986 ; Mitchell *et al.*, 1988; Erdman *et al.*, 1989 ; Bouzayen *et al.*, 1990, Rombaldi *et al.*, 1994 ; Ramassamy *et al.*, 1998). La protéine codée par le gène PA-ACO aurait probablement un site d'activité cytosolique. En effet, l'analyse structurale de sa séquence par les logiciels SOSUI (Takatsugu *et al.*, 1998) et SignalP V1.1 (Nielsen *et al.*, 1997) n'indique pas la présence de région trans-membranaire, ni de peptide signal.

### **I - 3 - Le gène *p69RF* d'abricot**

Le gène *p69RF* est un des gènes isolés par séquençage systématique de clones isolés et prélevés de manière aléatoire. Long de 1.280 pb, le gène *p69RF* code pour un polypeptide de 370 acides aminés (n° accession AF129500). La protéine *p69RF* présente environ 55 % d'identité avec les protéines 2A6 d'*Arabidopsis* (n° accession X83096, Trentmann et Kende, 1995) et les protéines *E8* de tomate (n° accession AF004914 ; n° accession X13437). Le pourcentage de similarité avec ces protéines est compris entre 67 et 71 %. Comme les protéines *E8* de tomate et 2A6 d'*Arabidopsis*, la séquence d'acide aminé *p69RF* présente également les motifs communs aux dioxygénases de type « 2-oxaloglutarate dépendant » (Fig. 13). Le rôle de la protéine 2A6 chez les plantes n'est pour l'instant pas connu. Par contre, des travaux récents ont suggéré l'implication de la protéine *E8* dans le mécanisme d'autoinhibition de la biosynthèse de l'éthylène (Penarrubia *et al.*, 1992 ; Kneissl et Deikman, 1996). Les homologues de séquences significatives ainsi que la présence des motifs fonctionnels communs entre les protéines *E8* et *p69RF* suggèrent qu'elles ont une fonction identique. C'est la raison pour laquelle nous avons étudié plus en détail le gène *p69RF* chez le fruit, en relation avec le dégagement éthylénique lié au processus de maturation.

Compte tenu du rôle central de l'éthylène dans le processus de maturation des fruits climactériques, l'isolement des gènes d'ACC synthase, d'ACC oxydase et *p69RF* constitue une première étape dans l'élucidation de la biologie moléculaire de la biosynthèse de l'éthylène associée à la maturation du fruit. Celle-ci se poursuivra par la caractérisation future de ces gènes en relation avec le développement du fruit et l'éthylène associé à la maturation.

## **II - LES GENES IMPLIQUES DANS LA PERTE DE FERMETE**

Au total 4 gènes ont été isolés du fruit d'abricot indépendamment de l'approche. Il s'agit des gènes codant pour la pectinéméthylestérase et la  $\beta$ -galactosidase isolés par amplification d'ADN *in vitro* (3'RACE-PCR) et de deux gènes d'expansine isolés par séquençage systématique et criblage de banque.

### **II - 1 - Le gène *PA-PME* codant pour la pectinéméthylestérase (PME) d'abricot**

La PME (EC 3.1.1.11) est l'enzyme qui catalyse la déméthylation des pectines permettant ainsi leur accessibilité aux enzymes polymérisantes ou aux hydrolases pariétales. Cette enzyme peut ainsi favoriser la croissance ou la dégradation des parois suivant la nature du tissu et son état physiologique (Fischer et Bennett, 1991). L'activité PME a été détectée chez la plupart des végétaux où de multiples isoformes ont été identifiées, dont plus de 8 chez la tomate (Pressey et Avants, 1972 ; Hall *et al.*, 1994), 3 chez la pêche (Glover et Brady, 1994) et 2 chez le kiwi (Giovane *et al.*, 1990).

Par la technique de 3'RACE-PCR (Frohman *et al.*, 1988), nous avons isolé un fragment d'ADNc, *PA-PME*, long de 746 pb (n° d'accèsion AF184079). L'ADNc *PA-PME*, code pour un polypeptide de 180 acides aminés contenant la partie C-terminale. L'analyse de la séquence du polypeptide déduit de l'ADNc *PA-PME* indique qu'il correspond vraisemblablement à la PME d'abricot. Ce polypeptide présente 37 à 47 % d'identité et 54 à 61 % de similarité avec les séquences protéiques correspondant aux gènes de PME, isolés chez *Arabidopsis thaliana*. Les PME isolées chez la plupart des organismes sont glycosylées. Peu conservées, elles présentent cependant deux régions très conservées, dont une en N-terminal, potentiellement impliquée dans le mécanisme catalytique, ainsi qu'un décapeptide dans leur partie centrale (Ray *et al.*, 1988 ; Plastow, 1988 ; Markovic et Jornvall, 1992).

L'alignement de la séquence polypeptidique du gène *PA-PME* avec d'autres polypeptides PME montre effectivement une faible identité en acides aminés (Fig. 14). L'analyse à l'aide du logiciel ScanPROSITE (Hofmann et al., 1999), révèle dans la séquence de l'ADNc *PA-PME* le décapeptide conservé 15-VEGSVDFIFG-26 de la partie centrale des PME, ainsi qu'un site potentiel 25-NSTA-30 de N-glycosylation.

10	20	30	40	50		
Abricot	SLYLHYGKQY	LKDCY <b>VEGSV</b>	<b>DFIFGN</b> STAL	LENCHIHCKG	A	GFITA
At-PME1	T.LDDN.NH.	F.N.. <b>I..AT</b>	<b>..IC.</b> SASS.	Y.R..L.SLS	PN	N
At-PME2	T.LDDK.RHF	F.E. <b>FIQ..I</b>	.....GRS.	YQD.T.NSIA	KG	NTSGV
At-PME3	T.HDDRGRH.	F.... <b>IQ..I</b>	.....AKS.	YQD.R.ISMA	NQLSPGSKAV	
At-PME4	T.YV.S.R.F	FRE. <b>DIY.T.</b>	.....AA.V	.Q..R.FARN	PPNGVNT...	
		60	70	80	90	100
Abricot	QSRKSSQETT	GYVFLRCVIT	G NGGTS	YAHLGRPWP	FGRVVFAYTF	
At-PME1	.GSITA.MR.	S ATEKSGF.	FLGCKLT.SG	STF.....A	YS.....S.	
At-PME2	TGSITA.GRQ	S.EDEQSGFS	FVNCKID.SG	EIL...A..A	YAT...SN.Y	
At-PME3	NGAVTANGRS	S.KDENSGFS	FVNCTI...G	HVW...A.R.	YS...VS.T	
At-PME4	Q..FNPNQ..	.I.IHNS.VK	.APGVQL.GV	KTY.....RS	YA.T.VIG.Y	
		110	120	130	140	150
Abricot	MDGCIRHVGW	NNWGTKENER	SACFYEYRYT	CFDSSVSTLT	QECLPLNKMC	
At-PME1	FSNVVAPQ..	.Q..DSTK.N	TVYYG..KCY	.PGADREQRV	EWS KQLSD	
At-PME2	.SGIITPE..	...GDSTK.K	TVT.G.HKCY	GPGADYKERV	LFG KQLTD	
At-PME3	.TDVIAPPE..	..FNDPSRDA	TIFYG..NCS	GPGADM.KRA	PYV QKLNE	
At-PME4	L.TL.EPN..	ID.DNVTALS	TLYYG..QNS	GPG.GTENRV	DWAGFHVISD	
		160	170	180	191	
Abricot	YYFSEYGTGM	NTAKYA IENL	CNLRTFH IRL	LSVWTRVI		
At-PME1	EEATVFLSK	DFIGGKDWLR	PAPSH.KNAP	KQTQNKEIN		
At-PME2	SEASSFIDV	SFIDGDEWLR	HTNIVSEHTS	KDIGDDLIGF	Y	
At-PME3	TQVALLINT	SFIDGDQWLQ	FSDL			
At-PME4	IQEAREFTLP	KFIDSASWLP	PTKVPFTINL			

**Figure 14 :** Alignement optimum des séquences d'acides aminés déduites des gènes de pectinéméthylestérase isolés chez l'abricot (*PA-PME*) et chez *Arabidopsis thaliana*.

Les différentes séquences d'acides aminés ont été alignées à l'aide du program Multalin (Corpet, 1988). Elles correspondent aux gènes de pectinéméthylestérase d'abricot (*PA-PME* n° d'accension AF184079 ), d'*Arabidopsis thaliana* (*At-PME1* n° AC007119 ; *At-PME2* n° AF006282 ; *At-PME3* n° AC000098 ; *At-PME4* n° AF069299). Les points correspondent aux acides aminés identiques. Les espaces ont été introduits pour optimiser l'alignement. Le décapeptide conservé entre les différentes pectinéméthylesterases est indiqué en gras alors que le site potentiel de N-glycosylation est en italique.



10	20	30	40	50	
Abricot	TNVDISSSE	LHGGKKPTL	TVQSAGHALH	VFVNGQFSGS	AFGTREQRQF
Arabidopsis	.S...GD.ES	F...EL...	II..T...V.	I.....L...	.....QN.R.
Asperge	.Y...AKN.E	F.KT..Y.Y.	.M.....V.	.I...L..T	.Y.SLDNPKL
Pomme	.DIT.G.D.A	F.KN..S.L.	.IF.....N	.I...L..T	VY.SL.NPKL
Tomate1	.DIE.DPT.G	F.NS.NW.W.	.F.....	.....LA.T	VY.SL.NPKL
Tomate2	..VN.A.N.G	F.KN..D.Y.	.M.....V..	.....KLSGT	VYGTLDNPKL
		60	70	80	90
Abricot	TFAKPVHLRA	GINKIALLSI	AVGLPNVGLH	YESWKTGILG	PVFLDGLGQG
Arabidopsis	.YQGKIN.HS	.T.R.....V	.....G.	F...N.....	..A.H..S..
Asperge	.YSGSAK.W.	.S...SI..V	S.....N.	F.T.N..V..	.T.T..NE.
Pomme	S.SQN.N..S	....L.....	S.....T.	F.T.NA.V..	.IT.K..NS.
Tomate1	..SNGIN...	.V...S....	.....P.	F.T.NA.V..	.S.N..NE.
Tomate2	.YSGN.K...	.....S...V	S.....V.	.DT.NA.V..	.T.S..NE.
		110	120	130	140
Abricot	RKDLTMQKWF	NKVGLKGEAM	DLVSPNGGSS	VDWIRGLAT	QTKQTLKWKYK
Arabidopsis	KM..SW...T	YQ.....	N.AF.TNTPS	IG.MDA..TV	.KP.P.T.H.
Asperge	KR..SL...T	YQI..H..TL	S.H.LT.S.N	.E.GEA S	.K .P.T...
Pomme	TW.MSGW..T	Y.T.....L	G.HTVT.S..	.E.VE.PSMA	EK .P.T...
Tomate1	TR...W....	Y.....L	S.H.LS.SP.	.E.VE...VA	.K .P.S...
Tomate2	SRN.AK...S	Y.....SL	S.H.LS.S..	.E.V....MA	.K .P.T...
		160	170	180	190
Abricot	AYFNAPGGDE	PLALDMRSMG	KGQVWINGQS	IGRYWMAY A	NGDCSLCSYI
Arabidopsis	T..D..EGN.	.....EG..	...I.V..E.	.....T... .	T....H...T
Asperge	TF....P.N.	.....NT..	...I.....	.....P..K.	S.S.GS.D.R
Pomme	.T....P..A	.....G....	...I.....	V..H.PG.I.	R.S..D...A
Tomate1	TT....D.N.	.....NT..	.....	L..H.P..KS	S.S..V.N.T
Tomate2	.T.....ND	.....A...	...I....EG	V..H.PG.I.	Q...SK...A
		210	220	230	240
Abricot	GTFRPTKCQL	GCGQPTQRWY	HVPRSWLKPT	KNLMVMFEEL	GGDPSKITLV
Arabidopsis	..YK.N...T	.....	...A....S	Q..L.I....	..N..TVS..
Asperge	..YNEK..LS	N..EAS....	.....I..	G.FL.VL..W	....TG.SM.
Pomme	..YDDK..RT	H..E.S....	.I.....T..	G..L.V...W	....R.S..
Tomate1	.W.DEK..LT	N..EGS....	.....Y..	G..L.V...W	....YG....
Tomate2	..NEK...T	N....S....	.....S	G..L.V...W	..N.TG.S..
		260	270	280	290
Abricot	KRSVAGVCAD	LQEHHPNAEK	FDIDSHEESK	TLHQAQVHLQ	CVPGQSISSI
Arabidopsis	....S....E	VS.Y...IKN	WQ.E.YGKGQ	.F.RPK...K	.S...A.A..
Asperge	....S...E	VE.LQ.TMDN	WRTKAYG	RPK...S	.D...KM.K.
Pomme	E.GT.LDAKK	.			
Tomate1	..EIGS....	IY.WQ.QLLN	WQRLVSGKFD	RPLRPKA..K	.A...K....
Tomate2	R..R				
		310	320	330	340
Abricot	KFASFGTPTG	TCGSFQQGTC	HATNSHAIVE	K NCIG	RESCLVTVSN
Arabidopsis	.....L.	....Y..GE.	..AT.Y..L.	R.....K.V.	KAR.A..I..
Asperge	.....Q.	.....SE.S.	..HK.YDAF.	QEGLMQ.CV.	Q.F.S.N.AP
Pomme					
Tomate1	.....E.	V..N....S.	..PR.YDAFK	.	..V. K...S.Q.TP
Tomate2					
		360	370	384	
Abricot	SIFGTDPCPN	VLKRLSVEAV	CSTGLTANQP	DSRR	
Arabidopsis	.N..K.....	.....T....	.APETSVSTW	RP	
Asperge	EVFGGDPCPG	TMKKLAVEAI	CE		
Pomme					
Tomate1	EN..G...R.	...K.....I	..		
Tomate2					

**Figure 15 :** Alignement optimum des séquences d'acides aminés déduites des gènes de  $\beta$ -galactosidase isolés chez l'abricot (*PA- $\beta$ GAL*) et chez d'autres espèces végétales.

Les différentes séquences d'acides aminés ont été alignées à l'aide du program Multalin (Corpet, 1988). Les séquences d'acide aminés correspondent aux protéines de  $\beta$ -Galactosidase d'abricot (*PA- $\beta$ GAL* n° d'accension AF184080), d'Arabidopsis (n° Z99708), d'asperge (n° X77319), de tomate (tomate1 n° P48980; tomate2 n° AF020390) et de pomme (n° P48981). Les points correspondent aux acides aminés identiques. Les espaces ont été introduits pour optimiser l'alignement.

## **II - 2 - Le gène PA-βGAL codant pour la β-Galactosidase (β-Gal) d'abricot**

La β-Gal est l'enzyme qui hydrolyse les liaisons β(1→4) galactosides des courtes chaînes latérales pectiques libérant ainsi les résidus galactose. Cette activité a été démontrée aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* pendant la maturation des fruits (Fisher et Bennett, 1991 ; Fils-Lycaon et Buret, 1991 ; De Veau *et al.*, 1993 ; Ross *et al.*, 1993 ; 1994). Présente chez la plupart des organismes eucaryote et procaryote, l'enzyme a été purifiée chez de nombreux fruits (Fisher et Bennett, 1991 ; De Veau *et al.*, 1993 ; Ross *et al.*, 1994 ; Ali *et al.*, 1995 ; Kitagawa *et al.*, 1995 ; Biles *et al.*, 1997 ; Ali *et al.*, 1998). Plusieurs isoformes de l'enzyme ont été identifiées, dont 2 chez le poivre (Biles *et al.*, 1997), 3 chez la tomate, l'avocat et la papaye (Pressey, 1983 ; DeVeau *et al.*, 1993 ; Ali *et al.*, 1998) et 5 chez la poire du japon (Kitagawa *et al.*, 1995). L'activité de l'isoforme β-Gal II de tomate et de papaye augmente abondamment pendant la maturation du fruit, en corrélation positive avec l'augmentation du galactose libre (Carrington et Pressey, 1996 ; Ali *et al.*, 1998).

Nous avons isolé de l'abricot un fragment d'ADNc (PA-βGal n° d'accession AF184080) de 1.467 pb par 3'RACE-PCR. Il code pour un polypeptide de 376 acides aminés contenant la partie C-terminale et homologue à la β-galactosidase. Le polypeptide PA-βGal présente 54 à 64 % d'identité et 70 à 80 % de similarité avec les séquences protéiques correspondant aux gènes β-galactosidase isolés chez *Arabidopsis*, la tomate, l'asperge et la pomme (Fig. 15). Le fragment d'ADNc PA-βGal code vraisemblablement pour la partie inactive de la β-galactosidase d'abricot. Il ne contient pas de site potentiel de N-glycosylation alors que les protéines natives β-galactosidases sont probablement glycosylées (De Veau *et al.*, 1993 ; Ali *et al.*, 1998 ; Biles *et al.*, 1997 ; Smith *et al.*, 1998). La β-Gal fait partie des glycosyl hydrolases dont la séquence polypeptidique GGP[LIVM]xQxENE[FY], très conservée, serait impliquée dans le mécanisme catalytique (Davies et Henrissat, 1995 ; Henrissat *et al.*, 1995). Cette séquence caractéristique des glycosyl hydrolases n'est pas présente dans le polypeptide correspondant au gène PA-βGal.

## **II - 3 - Les gènes PA-EXPI et PA-EXP2 codant pour les Expansines d'abricot**

Par séquençage systématique de clone isolé, un fragment d'ADNc de 700 bp a été isolé d'une banque d'ADNc de fruit sur mûr. La comparaison de sa séquence à l'aide du logiciel BLAST (Altschul *et al.*, 1997) a montré qu'il est fortement homologue au gène d'expansine de concombre (Shcherban *et al.*, 1995). Les protéines d'expansines ont été purifiées pour la première fois dans les tissus végétatifs où leur rôle dans la croissance a été démontrée (McQueen-Mason *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1993; Keller et Cosgrove, 1995). L'expansine n'a pas d'activité hydrolytique et son mécanisme d'action n'est pour l'instant pas connu avec précision. Cependant, sa capacité à rompre les liaisons non covalentes (les ponts hydrogène) entre les filaments de cellulose et d'hémicellulose a été démontrée *in vitro* (McQueen-Mason et Cosgrove, 1994). Récemment, l'expansine a été proposée comme étant potentiellement impliquée dans la perte de fermeté chez la tomate (Rose *et al.*, 1997; Brummell *et al.*, 1999), d'où l'intérêt que nous lui avons porté dans cette étude.

Marqué radioactivement, le fragment d'ADNc de 700 pb isolé a été utilisé comme sonde pour cribler la banque d'ADNc de fruit sur mûr. Deux ADNc complets PA-EXPI (n° d'accession U93167) et PA-EXP2 (n° d'accession AF038815) ont été isolés. Leurs longueurs sont respectivement de 1.019 et 1.252 pb. Les séquences nucléotidiques des gènes PA-EXPI et PA-EXP2, ainsi que les séquences des polypeptides correspondants, confirment qu'ils codent pour deux protéines d'expansine différentes (Mbéguié-A-Mbéguié *et al.*, soumise pour publication à Plant Physiology). En effet, les polypeptides codés par les gènes PA-EXPI et PA-EXP2 présentent les caractéristiques communes aux protéines d'expansine isolées chez d'autres espèces. Ils sont fortement homologues (70 à 91 %) dans leur partie interne. Ils divergent dans les régions en N- et C-terminales avec un peptide signal d'environ 25 acides aminés. La masse moléculaire des protéines matures PA-EXPI et PA-EXP2, d'environ 24 kDa, est similaire à celle des protéines d'expansine purifiées chez d'autres espèces (McQueen-Mason *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1993; Keller et Cosgrove, 1995).

## **III - LES GENES IMPLIQUES DANS D'AUTRES METABOLISMES**

En plus des gènes impliqués dans les métabolismes de biosynthèse de l'éthylène et de perte de fermeté, et décrits plus en détail dans les précédents paragraphes, nous avons également isolé 3 gènes dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire des métabolites secondaires, en prélude à l'étude moléculaire du brunissement enzymatique et à celle de la

synthèse des pigments. Il s'agit d'un gène codant pour la polyphénoloxydase (*PA-PPO*, n° d'accèsion AF020786) et deux gènes codant pour la zéaxanthine époxydase (*PA-ZE* n° d'accèsion AF071888 et *PA-ZE2* n° d'accèsion AF159948). Le gène *PA-PPO* a été isolé par RT-PCR et criblage de banque, alors que *PA-ZE* et *PA-ZE2* l'ont été par séquençage systématique et criblage de banque. *PA-PPO*, long de 2.070 pb, code pour un polypeptide de 496 acides aminés dont l'homologie de séquence avec d'autres polyphénoloxydases est comprise entre 57,1 et 65,7 %. La structure primaire du polypeptide *PA-PPO* présente les deux domaines fonctionnels fixateurs de cuivre et très conservés entre les polyphénoloxydases (Chevallier *et al.*, 1999). Les gènes *PA-ZE* et *PA-ZE2* ont une taille respective de 2.323 et 2.205 pb. Identiques en séquences nucléotidiques, *PA-ZE* et *PA-ZE2* ne diffèrent qu'au niveau de leur extrémité 3' non codante. *PA-ZE* est plus long. Il contient, en effet, 118 nucléotides supplémentaires après la première queue poly A<sup>+</sup>. *PA-ZE* et *PA-ZE2* correspondent à un polypeptide unique de 661 aa qui présente une homologie de séquence allant de 78.2% à 82.4% avec les polypeptides des gènes de zéaxanthine époxydase isolés chez le tabac (Marin *et al.*, 1996), le poivre (Bouvier *et al.*, 1996) et la tomate (Burbidge *et al.*, 1997). Les polypeptides *PA-PPO* et *PA-ZE* ont une partie N-terminale qui présente des motifs communs au peptide signal des protéines chloroplastiques (Gavel et von Heijne, 1990), ce qui suggère, qu'*in vivo* ces protéines sont probablement localisées dans les chloroplastes.

Le séquençage systématique des clones isolés nous a permis d'isoler de nombreux autres gènes de taille variable (voir annexe 8). Les séquences nucléotidiques de ces gènes ont été analysées dans les trois cadres de lecture avec le logiciel BLAST 2.0 (Altschul *et al.*, 1997). La plupart des polypeptides correspondant aux gènes isolés chez l'abricot sont homologues à ceux des gènes connus chez d'autres espèces végétales. Le pourcentage d'homologie est au moins égal à 55 %. Compte tenu de la différence d'espèce, ces pourcentages peuvent être considérés comme significatifs. Un rôle hypothétique a ainsi pu être attribué aux différentes protéines correspondant à ces gènes. Elles sont impliquées dans différentes voies métaboliques, dont certaines sont associées au processus de maturation des fruits (métabolismes secondaires, métabolisme des parois, métabolisme des sucres). Ce résultat confirme le caractère complexe du processus de maturation.

Certains gènes de petite taille, comme celui codant pour la méthallothionéine de type II, sont présents en plusieurs copies. Cette redondance du gène de la méthallothionéine a également été rapportée chez d'autres espèces comme le riz (Liu *et al.*, 1995), la banane (Clendennen et May, 1997) ou le citron (Moriguchi *et al.*, 1998). Chez l'abricot, elle peut s'expliquer par la forte expression du gène chez le fruit (Mbéguié-A-Mbéguié *et al.*, 1997). La méthallothionéine a été identifiée comme une protéine de stress mais son rôle demeure

inconnu. Chez les plantes, son expression est induite par un grand nombre de facteurs dont la synthèse hormonale (éthylène, acide abscissique), la croissance, la maturation ou encore le stress qui interviennent également pendant le développement du fruit (Coupe *et al.*, 1995 ; Choi *et al.*, 1996 ; Whithelaw *et al.*, 1997).

Les différentes approches utilisées pour isoler les gènes ne tiennent pas compte de leur niveau d'expression respectif pendant le développement du fruit. De ce fait, bien qu'étant isolés du fruit sur mûr, ces gènes n'y sont pas forcément exprimés de manière spécifique. Ce qui ne nous permet pas d'établir avec certitude une relation entre le processus de maturation du fruit, le gène isolé et le métabolisme auquel il serait associé, d'où leur caractérisation plus détaillée. Cette caractérisation, dont les résultats seront décrits plus en détail, a surtout concerné les gènes impliqués dans les métabolismes liés au processus de maturation tels que :

- la biosynthèse de l'éthylène (gènes d'ACC synthase, d'ACC oxydase, et *p69RF*),
- la perte de fermeté (Expansine, PME et  $\beta$ -galactosidase) cibles de cette thèse.

Quant aux résultats de la caractérisation des gènes impliqués dans d'autres métabolismes et auxquels nous nous sommes également intéressés, ils seront donnés sous forme d'articles présentés en annexe.

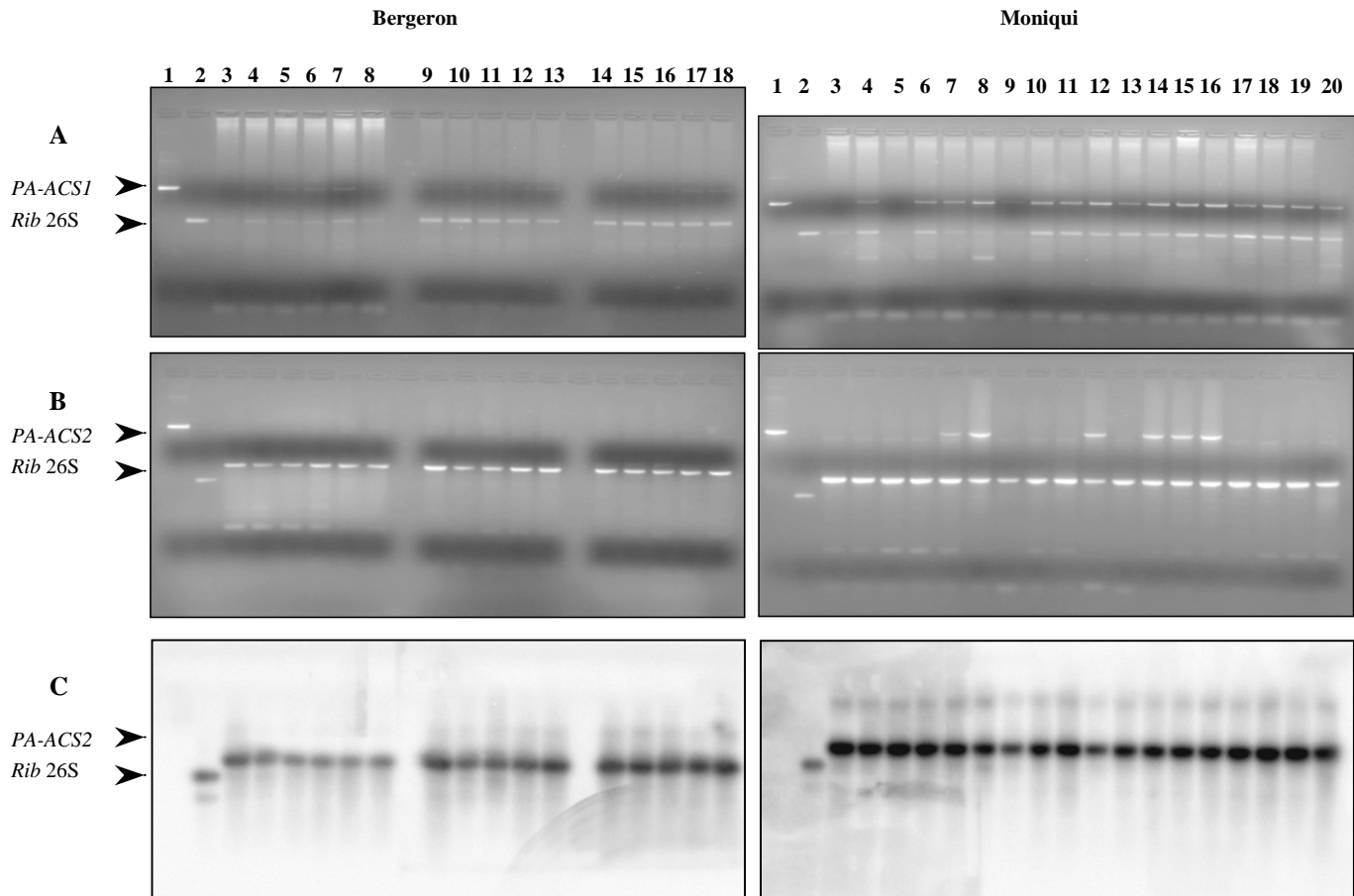
## **Caractérisation des gènes de la biosynthèse de l'éthylène**

### **I - LES GENES D'ACC SYNTHASE D'ABRICOT**

Trois gènes différents d'ACC synthase : *PA-ACS1*, *PA-ACS2* et *PA-ACS3* ont été isolés du tissu de fruit par RT-PCR. Dans cette étude, compte tenu des contraintes de temps, seuls les gènes *PA-ACS1* et *PA-ACS2* ont été partiellement caractérisés chez le fruit, ceci en rapport avec le processus de maturation. Les fragments d'ADNc, *PA-ACS1* et *PA-ACS2*, ont été utilisés comme sondes pour hybrider les ARN totaux extraits de fruit à différents stades de maturité. Aucun signal d'hybridation n'a été obtenu avec la sonde *PA-ACS1* et *PA-ACS3*, aussi bien chez Bergeron que chez Moniqui. Un très faible signal d'hybridation est obtenu, uniquement chez Moniqui, avec la sonde *PA-ACS2*. Dès lors, les techniques de RT-PCR et d'hybridation moléculaire, beaucoup plus sensibles, ont été utilisées pour analyser l'expression de ces gènes. Pour cela, des amorces spécifiques des gènes *PA-ACS1* et *PA-ACS2* ont été définies à l'aide du logiciel « GCG » (tableau 2), et utilisées en RT-PCR. Comme témoin interne RT-PCR, un fragment d'ADNc a été co-amplifié à partir des ARN ribosomiques constitutivement exprimés dans le tissu de fruit, quel que soit son stade de développement. Les fragments d'ADNc correspondant aux gènes *PA-ACS1* et *PA-ACS2* ont également été amplifiés dans les mêmes conditions, avec les mêmes amorces spécifiques, puis utilisés comme témoins positifs en hybridation moléculaire.

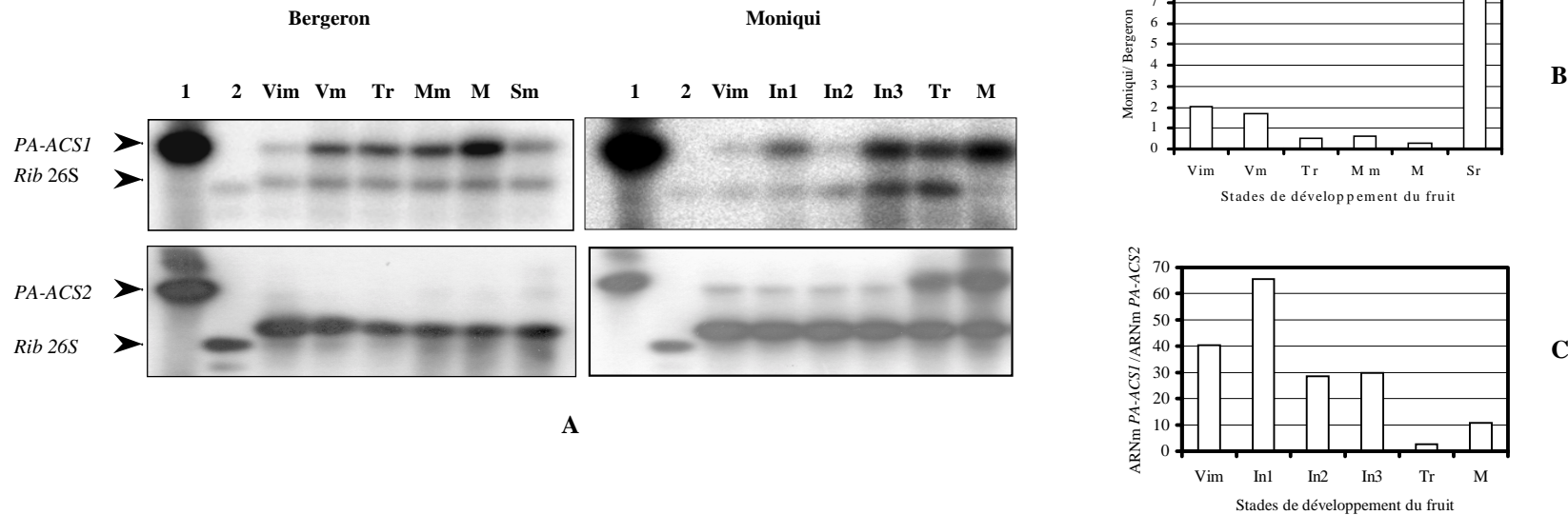
Les ADNc totaux ont été synthétisés par transcriptase inverse (RT) à partir de l'amorce antisens Oligo(dT). Deux fractions, de 2 µl chacune, de cet extrait RT ont ensuite été amplifiées par PCR avec les amorces ACS1-S et ACS1-AS, puis ACS2-S et ACS2-R, spécifiques respectivement des gènes *PA-ACS1* et *PA-ACS2*. Pour le témoin interne, les amorces Rib26-S et Rib26-AS, spécifiques du gène ribosomique, ont été utilisées. Les 32 cycles PCR sont faits avec l'enzyme ADN polymérase *AmpliTaq* dans le milieu réactionnel associé et décrit dans le tableau 3. Les conditions standard de PCR décrites dans le tableau 3 ont été utilisées, excepté qu'ici l'hybridation est faite à 42 °C pour la co-amplification des gènes *PA-ACS1* et ribosomique, et à 50°C pour celle des gènes *PA-ACS2* et ribosomique. Les amorces ribosomiques, dont la matrice est beaucoup plus abondante, sont ajoutées au milieu réactionnel seulement après les 12 premiers cycles afin d'éviter la saturation du milieu en fragments ribosomiques. Les fragments d'ADNc produits par PCR sont transférés sur membrane comme décrits dans le chapitre Matériel et Méthodes. Les sondes froides *PA-ACS1*, *PA-ACS2* et ribosomiques sont synthétisées par amplification du site de clonage du plasmide et marquées radioactivement. Les membranes sont hybridées à faible stringence

dans les conditions standards, simultanément avec les sondes PA-ACS1 et ribosomique pour le gène *PA-ACS1* et successivement avec la sonde PA-ACS2 et ribosomique pour le gène *PA-CAS2*. Après chaque hybridation, les membranes sont lavées successivement à faible stringence pendant 20 min et à 40°C puis à moyenne stringence pendant 1 heure et à 50°C (voir tableau 4).



**Figure 16 :** Analyse par électrophorèse des produits obtenus par RT-PCR avec les amorces spécifiques aux gènes *PA-ACS1* et ribosomique (A), *PA-ACS2* et ribosomique (B). La figure (C) correspond à l'hybridation des produits du gel (B) avec la sonde spécifique au gène ribosomique.

Les ARN totaux utilisés sont ceux extraits chez Bergeron et Moniqui en maturité sur l'arbre et après des traitements post-récoltes. Pour Bergeron, stade vert immature (piste 3), vert mature (piste 4), tournant (piste 5), mi-mûr (piste 6), Mûr (piste 7), sur mûr (piste 8). Les pistes 9 à 13 correspondent respectivement aux stades Vert immature, Vert mature, Tournant, Mi-mûr, Mûr traités à l'air et les pistes 14 à 18 correspondent aux mêmes stades traités au CO<sub>2</sub>. Pour Moniqui, les stades utilisés sont vert immature (piste 3), inductible 1 (piste 4), inductible 2 (piste 5), inductible 3 (piste 6), tournant (piste 7) et mûr (piste 8). Les pistes 9 à 12 correspondent respectivement aux stades vert immature, inductible 1, inductible 2, inductible 3. Les pistes 13 à 16 et 17 à 20 correspondent aux mêmes stades traités respectivement à l'éthylène et au 1-MCP. Aussi bien chez Bergeron que chez Moniqui, les pistes 1 et 2 correspondent aux produits de la PCR faite directement sur les gènes *PA-ACS1* ou *PA-ACS2* (piste 1) et ribosomique (piste 2).



**Figure 17 :** Analyse par RT-PCR de l'expression des gènes *PA-ACS1* et *PA-ACS2* pendant la maturation des fruits Bergeron et Monique sur l'arbre.

Les ARN totaux extraits d'abricot Bergeron et Monique pris à 6 stades de développement différents sont amplifiés simultanément avec les amorces spécifiques des gènes ribosomique et *PA-ACS1*, d'une part, et les amorces spécifiques des gènes ribosomique et *PA-ACS2*, d'autre part. Les stades de maturation utilisés sont Vim (vert immature), Vm (vert mature), Tr (tournant), Mm (mi-mûr), M (mûr) et Sm (sur mûr) pour Bergeron ; vert immature (Vim), In 1 (inductible 1), In 2 (inductible 2) et In 3 (inductible 3) pour Monique (A). Les transcrits *PA-ACS1* ou *PA-ACS2* (piste 1) ont été quantifiés à l'aide du logiciel ImageQuant (Molecular Dynamics) et rapportés au signal Ribosomique (piste 2). L'évolution des transcrits *PA-ACS1* a été comparée pendant la maturation de Bergeron et Monique (B) et à celle transcrits *PA-ACS2* chez Monique (C). Les gènes partiels *PA-ACS1*, *PA-ACS2* et ribosomique amplifiés avec les amorces spécifiques ont été utilisés comme témoins positifs en hybridation moléculaire (a, piste 1 et 2).



### **I - 1 - PA-ACSI et PA-ACS2 présentent des profils d'expression différents pendant le développement du fruit**

L'expression des gènes *PA-ACSI* et *PA-ACS2* a été étudiée chez Bergeron et Moniqui. Les fruits utilisés sont ceux correspondant aux stades vert immature (Vim), vert mature (Vm), tournant (Tr), mi-mûr (Mm), mûr (M) et sur-mûr (Mm) pour la variété Bergeron, et vert immature (Vim), inductible 1 (In1), inductible 2 (In2), inductible 3 (In3), tournant (Tr) et mûr (m) pour la variété Moniqui (tableau 1). Aussi bien chez Bergeron que chez Moniqui, deux fragments d'ADNc sont co-amplifiés par RT-PCR (Fig. 15). Lorsque les amorces spécifiques des gènes *PA-ACSI* et ribosomique sont utilisées, les deux fragments générés à partir des ARN totaux sont de tailles identiques (700 et 400 pb) à ceux obtenus après PCR sur les ADNc *PA-ACSI* et ribosomique (Fig. 16A). Lorsqu'on utilise simultanément les amorces spécifiques aux gènes *PA-ACS2* et ribosomique en RT-PCR, on obtient un fragment unique possédant une taille de 1.200 pb et identique à celui généré à partir de l'ADNc *PA-ACS2*. Etant donné que les amorces spécifiques ACS2-S et ACS2-R utilisées sont situées de part et d'autre de 3 sites potentiels d'introns, ce résultat indique l'absence d'ADN contaminant dans les préparations d'ARN utilisées en RT-PCR. L'unique fragment ribosomique obtenu, d'une taille de 500 pb, est quant à lui légèrement plus grand que celui issu d'une amplification de l'ADNc ribosomique (Fig. 16B). La différence de taille observée pour le fragment ribosomique pourrait résulter d'une fixation aspécifique de l'amorce plus amont sur l'ARN ribosomique. En effet, lorsque les produits RT-PCR sont hybridés uniquement avec la sonde ribosomique, seul le signal constitutif correspondant au fragment ribosomique est révélé (Fig. 16C). En RT-PCR, nous avons utilisé des températures d'hybridation différentes, soit 42 °C pour les amorces *PA-ACSI* et ribosomique, et 50 °C pour les amorces *PA-ACS2* et ribosomique. Ceci expliquerait en partie la fixation aspécifique des amorces ribosomiques.

Pendant la maturation du fruit Bergeron sur l'arbre, les gènes *PA-ACSI* et *PA-ACS2* présentent deux profils d'expression différents (Fig. 17A). Le profil d'expression du gène *PA-ACSI* est corrélé au dégagement d'éthylène. Les transcrits *PA-ACSI*, faiblement présents dès le premier stade de développement (fruit Vim, 89 JAA), augmentent sensiblement chez le fruit Vm (103 JAA). Dans le même laps de temps, aucune trace d'éthylène n'est détectée. A partir du stade Tr (110 JAA), où sont détectées les premières traces d'éthylène émis par le fruit, le profil d'accumulation des transcrits *PA-ACSI* pendant le développement du fruit corrobore celui de l'émission d'éthylène. Les transcrits *PA-ACSI* s'accumulent progressivement avec un maximum au stade M (127 JAA), correspondant au maximum

d'émission d'éthylène du fruit, avant de décroître au stade Sm (131 JAA). Dans nos conditions expérimentales, aucun transcrit *PA-ACS2* n'est détecté chez Bergeron quel que soit le stade de développement du fruit.

Chez la variété Moniqui, qui produit environ 100 fois plus d'éthylène que la variété Bergeron dans les phases tardives de son développement, les transcrits *PA-ACS1* sont également détectés dès le premier stade de développement fruit Vim (89 JAA) (Fig. 17A). Ils augmentent chez le fruit In1 (97 JAA) et décroissent au stade In2 (99 JAA). Pendant ce temps, aucune trace d'éthylène n'est détectée chez le fruit. Dans les phases tardives de la maturation, In3 (103 JAA), Tr (106 JAA) et M (110 JAA), les transcrits *PA-ACS1* augmentent progressivement alors que l'éthylène n'est détecté qu'à partir du stade In3 (103 JAA). Quant aux transcrits *PA-ACS2*, ils ne sont détectés que dans les phases tardives de la maturation, stades Tr (106 JAA) et M (110 JAA) où leurs taux augmentent progressivement de concert avec l'émission de l'éthylène. Au stade Tr (106 JAA), les transcrits *PA-ACS2* sont détectés chez Moniqui en même temps que le sont les premières traces d'éthylène. Les signaux d'hybridation observés aux stades antérieurs sont des artéfacts d'hybridation avec la sonde ribosomique, lesquels n'ont pu être totalement éliminés après 2 heures de déshybridation à très forte stringence.

Chez les deux variétés, le profil d'accumulation des ARNm du gène *PA-ACS1* est similaire au dégagement éthylénique. De plus, lorsqu'on compare l'évolution quantitative des ARNm *PA-ACS1* chez Bergeron et Moniqui (Fig. 17B), une adéquation entre l'expression du gène *PA-ACS1* et la différence d'éthylène émis par les deux variétés est observée. Une différence significative est observée au stade M (110 JAA), où le taux de transcrits *PA-ACS1* chez Moniqui est 7 fois supérieur à celui de Bergeron. Ces résultats suggèrent une implication de l'éthylène dans la régulation du gène *PA-ACS1*. Cependant, aussi bien chez Bergeron que chez Moniqui, le gène *PA-ACS1* s'exprime bien avant que ne soient détectées les premières traces d'éthylène. De ce fait, il est possible que l'induction du gène *PA-ACS1* soit le résultat d'une sensibilité tissulaire à de très faibles doses d'éthylène endogène présentes dans les phases précoces, que la faible sensibilité de l'appareil de mesure ne permet pas de détecter ou que l'expression du gène *PA-ACS1* soit régulée que par l'éthylène mais aussi par d'autres facteurs développementaux mis en place pendant la maturation du fruit. La coexistence des deux facteurs dans la régulation du gène *PA-ACS1* étant également envisageable dans la mesure où ils ne sont mutuellement exclusifs.

Aucun ARNm correspondant au gène *PA-ACS2* n'est amplifié chez la variété Bergeron. Ce résultat est surprenant dans la mesure où tous les gènes d'ACC synthase ont été isolés chez cette variété. Il peut cependant s'expliquer par le faible taux d'ARNm *PA-ACS2*

chez cette variété. Cette faible expression du gène *PA-ACS2* chez Bergeron résulterait d'une induction différentielle des gènes *PA-ACS1* et *PA-ACS2* pendant la maturation ou, d'une émission d'éthylène ou encore, d'une sensibilité à celle-ci, insuffisantes pour induire le gène *PA-ACS2* au cours de la maturation. Pour l'isolement des fragments d'ADNc, deux fois 40 cycles PCR ont été nécessaires. Il est donc possible que les 32 cycles PCR effectués pour l'étude de l'expression n'aient pas permis d'amplifier suffisamment les messagers *PA-ACS2* pour permettre leur détection par hybridation. Chez la variété Moniqui, les ARNm *PA-ACS2* s'accumulent de concert avec le dégagement éthylénique, ce qui suggère une implication de l'éthylène dans la régulation de l'expression du gène. Cependant, la quantité d'éthylène émise par Moniqui au stade M (11 nmoles.h<sup>-1</sup>.kg MF<sup>-1</sup>), où sont détectés les premiers transcrits *PA-ACS2*, est nettement inférieure au maximum d'éthylène produit par Bergeron au cours de sa maturation (44 nmoles.h<sup>-1</sup>.kg MF<sup>-1</sup>) où aucun transcrit du gène n'est détecté. L'absence des transcrits *PA-ACS2* chez Bergeron ne serait donc pas liée à la différence quantitative d'éthylène émis par les deux variétés, mais probablement à une différence de sensibilité tissulaire à l'hormone comme nous l'avons précédemment suggéré.

Chez la variété Moniqui où une accumulation des deux types d'ARNm a pu être détectée, l'expression du gène *PA-ACS1* est prépondérante dans les premières phases du développement du fruit (phase préclimactérique), alors que celle de *PA-ACS2* l'est plutôt dans les phases tardives (phase climactérique) (Fig. 17C). De nombreux autres facteurs, tels la blessure, la sénescence, la croissance, etc... peuvent également induire la synthèse d'éthylène via une induction des gènes d'ACC synthase et d'ACC oxydase (Yang et Hoffmann, 1984 ; Kende, 1993; Zarembinski et Theologis, 1994 ; Flühr et Mattoo, 1996). Il est donc possible que chez l'abricot, les gènes *PA-ACS1* et *PA-ACS2* soient différemment induits car impliqués dans la synthèse d'éthylène liée à des processus physiologiques différents.

En ce qui concerne le gène *PA-ACS1*, il peut être associé au processus de croissance. En effet, une forte accumulation des ARNm correspondants est observée par northern chez les jeunes feuilles d'abricot en croissance et leur taux n'est pas modulé par la blessure des feuilles. *PA-ACS1* n'est donc pas spécifique du fruit. De plus, chez les deux variétés d'abricot Bergeron et Moniqui, la croissance du fruit se poursuit pendant tout le développement (Chahine, 1999). Celle-ci est généralement associée à un métabolisme des sucres libres et polysaccharides pariétaux dont les substrats sont également connus pour induire la synthèse d'éthylène chez les fruits (Gross, 1985; Simpson *et al.*, 1998 ; Cutillas-Iturralde *et al.*, 1998).

Quant au gène *PA-ACS2*, il est probablement associé à l'éthylène de la maturation. En effet, ses transcrits sont majoritairement exprimés dans la phase climactérique chez

Moniqui où leur niveau évolue de concert avec le dégagement éthylénique et l'état de maturation du fruit.

## **I - 2 - Effet des traitements post-récoltes sur l'expression des gènes *PA-ACS1* et *PA-ACS2***

Nous avons précédemment suggéré qu'au cours de la maturation de l'abricot l'éthylène est impliqué dans la régulation de l'expression du gène *PA-ACS2*, alors que dans la régulation du gène *PA-ACS1* des facteurs développementaux autres que l'éthylène interviendraient (Fig. 17). Afin de tester ces différentes hypothèses, nous avons étudié l'expression de ces deux gènes chez les fruits traités au 1-MCP et chez ceux stockés sous une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> après récolte. Le 1-MCP et le CO<sub>2</sub> sont des inhibiteurs de l'action de l'éthylène. Leur effet inhibiteur sur le processus de maturation des fruits après récolte a été démontré chez de nombreux fruits dont l'abricot (Fig. 3 et 4 ; Wankier *et al.*, 1970 ; Kader, 1986 ; Wang, 1990; Sisler et Serek, 1999). Le 1-MCP agit en bloquant les sites récepteurs de l'éthylène alors que le mécanisme d'action du CO<sub>2</sub> est pour l'instant inconnu.

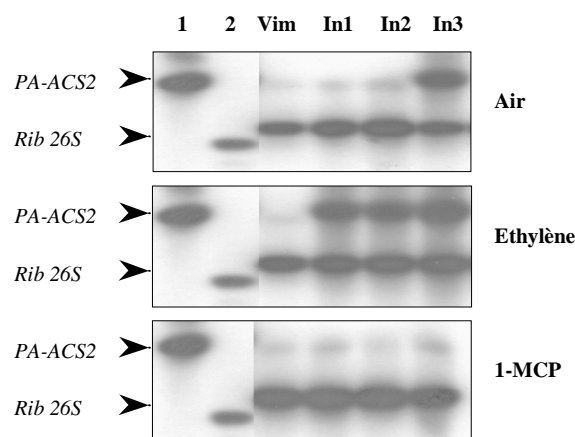
### **I - 2 - 1 - Effet de l'éthylène et du 1-MCP sur l'expression des gènes *PA-ACS1* et *PA-ACS2***

De l'éthylène exogène et du 1-MCP ont été appliqués sur les fruits Moniqui cueillis aux stades Vim (89 JAA), In1 (97 JAA), In2 (99 JAA) et In3 (103 JAA). Les ARN totaux extraits de ces fruits ont été analysés par RT-PCR et hybridation moléculaire. Les résultats sont présentés dans la Fig. 18.

Chez les fruits laissés à l'air, les transcrits *PA-ACS2* sont absents chez les fruits Vim (89 JAA), In1 (97 JAA) et In2 (99 JAA) où aucune trace d'éthylène n'est détectée. Ils augmentent abondamment chez le fruit In3 (103 JAA) qui émet de l'éthylène (Fig. 4B). Le traitement des fruits à l'éthylène exogène n'a aucun effet sur l'expression du gène *PA-ACS2* chez le fruit pris au stade Vim qui n'émet pas non plus d'éthylène détectable (Fig. 4B). Ce qui indique que le fruit Vim est non seulement inapte à mûrir mais également insensible à l'éthylène. Les premiers transcrits *PA-ACS2* sont détectés chez les fruits In1 (97 JAA), donc aptes à mûrir, en même temps que sont détectées les premières traces d'éthylène (0,45  $\mu\text{moles.kgMF}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ). Il y a un synchronisme entre l'émission d'éthylène et l'apparition des ARNm *PA-ACS2*. De plus, dès que le fruit acquiert l'aptitude à mûrir (In1), l'éthylène exogène induit l'expression du gène *PA-ACS2*, mais pas l'air. Le taux d'ARNm *PA-ACS2*

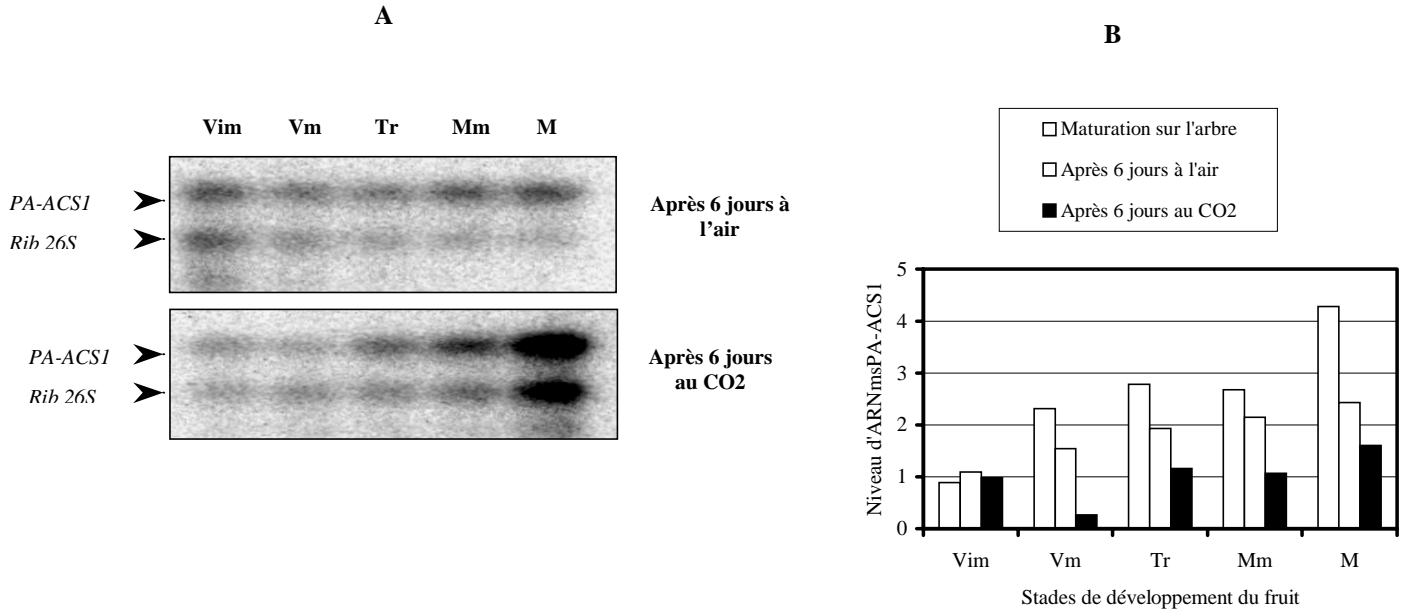
augmente progressivement aux stades plus avancés, In2 (99 JAA) et In3 (103 JAA). Cependant, la vitesse d'augmentation des transcrits *PA-ACS2* chez ces fruits est faible comparé à la vitesse d'émission de l'éthylène. Ces résultats mettent en avant deux facteurs importants dans l'induction du gène *PA-ACS2* chez Monique : l'éthylène et la sensibilité tissulaire à l'éthylène. En effet, dès que le fruit acquiert l'aptitude à mûrir, le gène *PA-ACS2* est induit par l'éthylène et ce, de manière directe. Après un traitement au 1-MCP, aucun transcrite *PA-ACS2* n'est détecté chez les fruits quel que soit leur stade de développement, y compris au stade In3 (103 JAA). A ce stade de développement, le fruit n'émet pas d'éthylène pendant la maturation sur l'arbre, chez le témoin laissé à l'air et après traitement éthylène. Par contre, une quantité significative d'éthylène, issue probablement d'un stress, a été détectée chez le fruit traité au 1-MCP (44 nmoles.kg MF<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) (Fig. 4B). Le fait que le gène *PA-ACS2* ne soit pas induit chez ce dernier constitue un argument supplémentaire en faveur d'une induction directe et spécifique du gène *PA-ACS2* par l'éthylène de la maturation. Il tend également à confirmer l'hypothèse que nous avons émise précédemment, à savoir l'implication du gène *PA-ACS2* dans la biosynthèse de l'éthylène de la maturation.

Chez les fruits Monique traités à l'éthylène et au 1-MCP, l'expression du gène *PA-ACSI* n'a été analysée que par RT-PCR (Fig 16A). Une légère accumulation des transcrits *PA-ACSI* est certes détectée chez les fruits traités à l'éthylène, mais après un traitement au 1-MCP le gène n'est pas totalement inhibé comme l'est *PA-ACS2*. Ceci corrobore le fait que le gène *PA-ACSI* n'est pas exclusivement régulé par l'éthylène.



**Figure 18 :** Effet de l'éthylène et du 1-MCP sur l'expression du gène *PA-ACS2* chez Monique.

Les ARN totaux extraits des fruits d'abricot Monique pris à 4 stades de développement différents sont amplifiés simultanément avec les amorces spécifiques du gène *PA-ACS2* et ribosomique. Les fruits sont traités en continu au 1-MCP (plus 1ppm) et pendant 48 heures à l'éthylène (environ 20 ppm). L'expression du gène *PA-ACS2* est faite sur les ARN totaux extraits du fruit traité au bout de 7 jours pour les fruits Vim (vert immature) et In 1 (inductible 1), 5 jours pour les fruits In 2 (inductible 2), et 4 jours pour le fruit In 3 (inductible 3). Comme témoin, les fruits ont été laissés pendant le même laps de temps à l'air. Les pistes 1 et 2 représentent l'hybridation des produits de la PCR faite respectivement sur les ADNc *PA-ACS2* et ribosomique.



**Figure 19 : Effet du CO<sub>2</sub> sur l'expression du gène *PA-ACSI* chez Bergeron.**

Les ARN totaux extraits des fruits d'abricot Bergeron pris à 6 stades de développement différents sont amplifiés simultanément avec les amorces spécifiques des gènes ribosomique et *PA-ACSI* (A). Les stades de maturation utilisés sont Vim (vert immature), Vm (vert mature), Tr (tournant), Mm (mi-mûr) et M (mûr). Les transcrits *PA-ACSI* ont été quantifiés à l'aide du logiciel ImageQuant (Molecular Dynamics) et rapportés au signal ribosomique. L'évolution du taux des transcrits *PA-ACSI* chez les fruits traités est comparée à celle du fruit pendant sa maturation sur l'arbre (B).

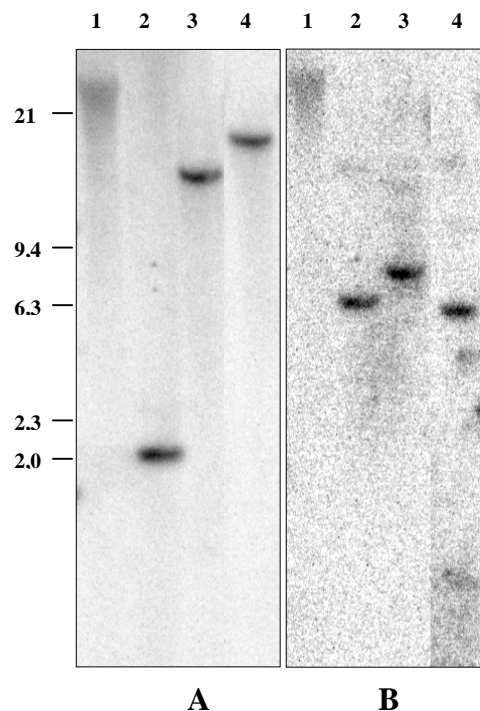
### I - 2 - 2 - Effet du CO<sub>2</sub> sur l'expression des gènes PA-ACSI et PA-ACS2

Les ARN totaux ont été extraits des tissus de fruits Bergeron récoltés à différents stades de maturation, Vim (89 JAA), Vm (103 JAA), Tr (110 JAA), Mm (124 JAA) et M (127 JAA) et stockés sous une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub>. Les résultats de leur analyse par RT-PCR et hybridation moléculaire sont représentés dans la Fig 19A. Aucun signal d'amplification, ni d'hybridation n'ont été obtenus avec le gène PA-ACS2. Le CO<sub>2</sub> ralentit le développement du fruit et inhibe l'expression du gène PA-ACSI. Au stade Vim (89 JAA), le niveau de transcrits PA-ACSI détecté est comparable aussi bien chez les fruits traités à l'air que chez ceux traités au CO<sub>2</sub>. A partir du stade vert mature, les transcrits PA-ACSI augmentent continuellement jusqu'au stade M (127 JAA) aussi bien chez les fruits traités au CO<sub>2</sub> que chez ceux laissés à l'air. La quantification du signal d'hybridation indique que le taux de transcrits PA-ACSI est réduit d'environ 34 à 80 % chez les fruits traités au CO<sub>2</sub>, comparé à ceux laissés à l'air. Ce profil d'expression génique est en corrélation positive avec le dégagement éthylénique observé chez les fruits et indique un effet inhibiteur du CO<sub>2</sub> sur le gène PA-ACSI (Fig. 6B). La réduction maximale des transcrits PA-ACSI observée au stade Vm (103 JAA) confirme l'hypothèse selon laquelle l'expression de PA-ACSI serait plus spécifique des phases précoces de la maturation. Les niveaux des ARNm PA-ACSI chez les fruits en maturité sur l'arbre et ceux maintenus à l'air après récolte ont été quantifiés et donnés dans la Fig. 19B. Ramené au standard interne, une baisse significative de l'ordre de 32 à 43 % du niveau des transcrits PA-ACSI est observée chez le témoin maintenu à l'air, qui pourtant produit plus d'éthylène. De plus, si l'on tient compte des résultats partiels obtenus chez Monique où le gène PA-ACSI est légèrement induit par l'éthylène et partiellement inhibé par le 1-MCP, il est concevable de penser que l'expression du gène PA-ACSI soit régulé par des facteurs développementaux autres que l'éthylène de la maturation. Par conséquent, l'induction du gène PA-ACSI observée pendant la maturation du fruit est plus associée au développement général du fruit qu'à l'éthylène de la maturation. Partant de là, il n'est pas étonnant d'observer, chez les fruits traités à l'air et au CO<sub>2</sub>, une inadéquation entre l'expression du gène PA-ACSI et le niveau d'éthylène émis.

### I - 3 - Complexité des gènes PA-ACSI et PA-ACS2 dans le génome d'abricot

Il est aujourd'hui admis que l'ACC synthase est codée par une large famille multigénique. Au moins 6 de ces membres ont été identifiés chez la tomate (Rottmann *et al.*, 1991). Nous avons isolé trois gènes d'ACC synthase d'abricot : PA-ACSI, PA-ACS2 et PA-ACS3. L'analyse structurale de ces gènes a suggéré qu'ils sont différents. Afin de confirmer

cette hypothèse, du moins en ce qui concerne les gènes *PA-ACS1* et *PA-ACS2*, nous avons analysé leur complexité respective dans le génome d'abricot (Fig. 20). Pour ce faire, l'ADN génomique d'abricot Bergeron a été digéré par les enzymes *Sma* I, *Hind* III, *Nde* I et *Xba* I et transféré sur une membrane. La membrane est hybridée dans les conditions standard avec le fragment génomique *PA-ACS1* et successivement lavée à faible stringence pendant 40 min à 40 °C et 20 min à 45°C (tableau 4). Un seul fragment d'hybridation d'environ 2 kbp, 9,4 kbp et 11 kpb, est détecté respectivement sur les pistes *Hind* III, *Nde* I et *Xba* I. La membrane est déshybridée pendant 2 heures à forte à très forte stringence (tableau 4), réhybridée avec la sonde *PA-ACS2* et lavée dans les mêmes conditions que précédemment. Un fragment d'hybridation d'environ 6,5 kbp, 8 kbp et 6,4 kbp est obtenu respectivement sur les pistes *Hind* III, *Nde* I et *Xba* I. D'après leur carte de restriction, les séquences nucléotidiques *PA-ACS1* et *PA-ACS2* ne disposent pas des sites de restriction des enzymes utilisées pour digérer l'ADN. L'obtention d'un fragment unique avec les sondes *PA-ACS1* et *PA-ACS2* indique qu'une seule copie de ces gènes est présente dans le génome d'abricot. L'analyse structurale des séquences nucléotidiques des gènes *PA-ACS1* et *PA-ACS2* a montré qu'ils sont différents (Fig. 10 et Tableau 5). En accord avec cette hypothèse, une différence est observée entre les profils d'hybridation des fragments d'ADN lorsque les sondes *PA-ACS1* et *PA-ACS2* sont utilisées.



**Figure 20 :** Complexité des gènes *PA-ACS1* et *PA-ACS2* chez l'abricot par hybridation moléculaire des fragments d'ADN.

L'ADN génomique d'abricot est digéré par les enzymes *Sma* I (piste 1), *Hind* III (piste 2), *Nde* I (piste 3) et *Xba* I (piste 4). Transférés sur une membrane, les fragments d'ADN sont successivement hybridés avec les fragments génomique *PA-ACS1* (A) et d'ADNc *PA-ACS2* (B) marqués radioactivement. L'ADN du bactériophage  $\lambda$  digéré par l'enzyme *Hind* III (promega) est utilisé comme marqueur de masse moléculaire.

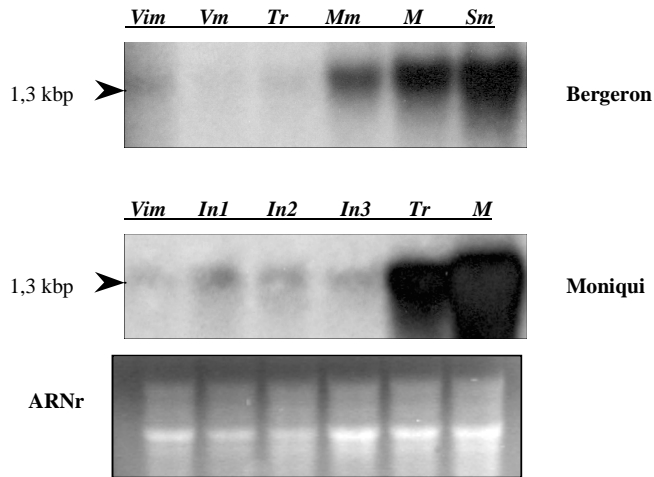


## **II - LE GENE D'ACC OXYDASE D'ABRICOT PA-ACO**

### **II - 1 - Accumulation des ARNm du gène PA-ACO pendant le développement du fruit sur l'arbre**

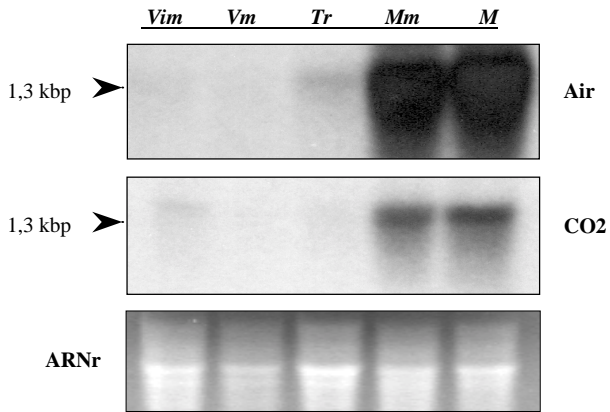
Dans de nombreux cas de figure, il est démontré que l'induction de la synthèse d'éthylène s'accompagne d'une néosynthèse de transcrits d'ACC synthase et d'ACC oxydase (Yang et Hoffman, 1984 ; Kende, 1993 ; Zarebinski et Theologis, 1994 ; Flühr et Mattoo, 1996). Nos résultats précédents ont montré, aussi bien chez Bergeron que chez Moniqui, une corrélation positive entre le dégagement éthylénique et l'expression des gènes d'ACC synthase (*PA-ACSI* et *PA-ACS2*). Sur les fruits pris aux mêmes stades de maturation, les ARN totaux sont extraits et transférés sur une membrane. Celle-ci est ensuite hybridée dans les conditions standards avec l'ADNc complet *PA-ACO* marqué radioactivement et lavée à faible stringence pendant 40 min à 40°C, 20 min à 45°C et 20 min à 45°C (tableau 4).

Un seul transcrit de 1,3 kbp est détecté à tous les stades de maturité examinés, aussi bien chez Bergeron que chez Moniqui (Fig. 21). Chez les deux variétés, les transcrits *PA-ACO* sont détectés à un niveau basal dans les premiers stades de la maturation ; Vim (89 JAA), Vm (103 JAA) et Tr (110 JAA) pour la variété Bergeron ; Vim (89 JAA), In1 (97 JAA), In2 (99 JAA) et In3 (103 JAA) pour la variété Moniqui. Le gène d'ACC oxydase est connu pour s'exprimer de manière constitutive dans les tissus végétaux (Yang et Hoffman, 1984 ; Kende, 1993 ; Zarebinski et Theologis, 1994 ; Flühr et Mattoo, 1996). Il n'est donc pas étonnant que les transcrits de ce gène soient détectés dès les premiers stades de développement de l'abricot. Le taux d'ARNm *PA-ACO* augmente abondamment et de manière progressive dans les stades tardifs de la maturation ; Mm (mi-mûr, 124 JAA) jusqu'au stade Sm (sur-mûr, 131 JAA) pour Bergeron ; tournant (Tr, 106 JAA) et mûr (M, 110 JAA) pour Moniqui. Cette augmentation des ARNm d'ACC oxydase est corrélée au dégagement éthylénique. De plus, la quantification des signaux d'hybridation indique que, à stade de maturité équivalent (tournant et mûr), le niveau des ARNm *PA-ACO* est plus important (environ 6 fois) chez la variété Moniqui qui produit plus d'éthylène. Ces résultats suggèrent une implication de l'éthylène dans la régulation du gène *PA-ACO*. Par analogie au gène *PA-ACSI*, l'expression du gène *PA-ACO* dans les premières phases de développement du fruit, où aucune trace d'éthylène n'est détectée, peut également suggérer une forte sensibilité du gène à l'éthylène et sa régulation par des facteurs autres que l'éthylène.



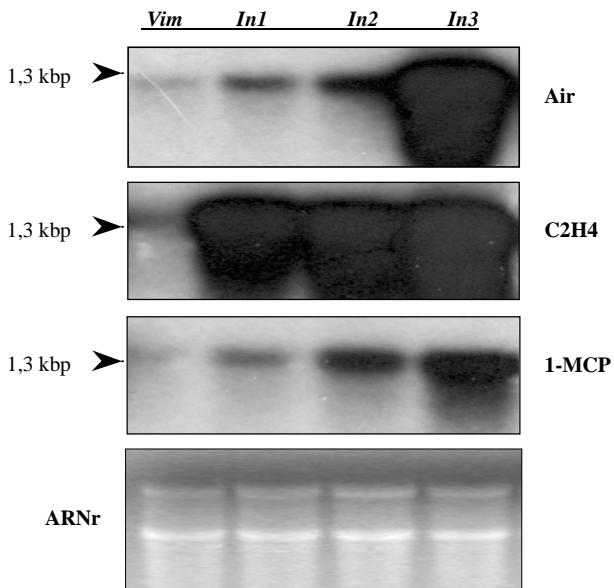
**Figure 21 :** Expression du gène *PA-ACO* pendant la maturation du fruit d'abricot Bergeron et Moniqui sur l'arbre.

Les ARN totaux extraits de fruits Bergeron et Moniqui sont hybridés avec l'ADNc complet *PA-ACO* marqué radioactivement. Les fruits utilisés sont ceux pris aux stades *Vim* (vert immature), *Vm* (vert mature), *Tr* (tournant), *Mm* (mi-mûr), *M* (mûr) et *Sm* (sur mûr) pour Bergeron et vert immature (*Vim*), *In 1* (inductible 1), *In 2* (inductible 2), *In 3* (inductible 3), *Tr* (tournant) et *M* (mûr) pour Moniqui. Une quantité équivalente d'ARN totaux (environ 15 µg) est déposée d'une piste à l'autre comme le montre la photographie sous UV des ARNs ribosomiques après coloration des ARN totaux à l'acrydine orange et avant leur transfert sur membrane.



**Figure 22 :** Effet du CO<sub>2</sub> sur l'expression du gène *PA-ACO* chez Bergeron.

Les ARN totaux sont extraits du fruit Bergeron traité au CO<sub>2</sub> comme décrit dans le chapitre I. Séparés sur membrane, ils sont hybridés à faible stringence avec l'ADNc complet d'ACC oxydase marqué au  $\alpha^{32}$ PdCTP. Les fruits traités sont ceux pris aux stades Vim (vert immature, Vm (vert mature), Tr (tournant, Mm (mi-mûr) et M (mûr).



**Figure 23 :** Effet de l'éthylène et du 1-MCP sur l'expression du gène *PA-ACO* chez Monique.

Les ARN totaux sont extraits du fruit Monique traités à l'éthylène et au 1-MCP comme décrit dans le chapitre I. Séparés sur membrane, ils sont hybridés à faible stringence avec l'ADNc complet d'ACC oxydase marqué au  $\alpha^{32}$ PdCTP. Les fruits traités sont ceux pris aux stades Vim (vert immature, In1 (inductible 1), In2 (inductible 2) et In (inductible 3).

## **II - 2 - Effet des traitements post-récolte sur l'accumulation des ARNm du gène PA-ACO**

Les résultats précédents ont suggéré une régulation positive de l'expression du gène d'ACC oxydase par l'éthylène pendant la maturation de l'abricot. Un tel comportement du gène d'ACC oxydase a été rapporté chez de nombreux autres fruits (Kende, 1993 ; Zarembinski et Theologis, 1994 ; Flühr et Mattoo, 1996). Nous avons également suggéré, notamment dans le cas du gène *PA-ACSI*, que des facteurs développementaux, autre que l'éthylène, peuvent réguler l'expression des gènes. L'expression du gène *PA-ACO* a été analysée par northern blot chez les fruits Bergeron et Moniqui après des traitements gazeux à l'éthylène, 1-MCP et CO<sub>2</sub> (Fig. 22 et 23).

### **II - 2 - 1 - Effet du CO<sub>2</sub> sur l'accumulation des ARNm du gène PA-ACO**

Les ARN totaux extraits d'abricots Bergeron aux stades vert immature, vert mature, tournant, mi-mur et mûr traités à l'air (témoin) et au CO<sub>2</sub> ont été hybridés avec l'ADNc d'ACC oxydase (Fig. 22). Aussi bien à l'air que sous atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub>, le profil d'expression du gène *PA-ACO* est similaire et étroitement corrélé au dégagement éthylénique (Fig. 6A). Chez les fruits maintenus à l'air, les premiers transcrits *PA-ACO* détectés au stade tournant, augmentent abondamment aux stades mi-mûr et mûr. Le niveau de ces transcrits est environ 1 à 2 fois plus important que chez les fruits en maturité sur l'arbre. A stade de maturité équivalent, par rapport au témoin, le taux des transcrits d'ACC oxydase est réduit de l'ordre de 47 à 70 % chez les fruits traités au CO<sub>2</sub>. L'expression du gène *PA-ACO* est induite de concert avec l'émission d'éthylène aussi bien chez le fruit en maturité sur l'arbre qu'après récolte alors que l'inverse est obtenu avec le gène *PA-ACSI*. Ceci suggérerait l'implication de l'éthylène dans la régulation du gène *PA-ACO*. Afin de vérifier de manière directe cette hypothèse, l'expression du gène *PA-ACO* chez les fruits traités à l'éthylène et au 1-MCP a été comparée.

### **II - 2 - 2 - Effet de l'éthylène et du 1-MCP sur l'accumulation des ARNm du gène PA-ACO**

Les ARN totaux extraits de tissus de fruits Moniqui pris aux stades Vim (89 JAA), In1 (97 JAA), In2 (99 JAA) et In3 (103 JAA) ont été hybridés avec l'ADNc complet *PA-ACO* marqué radioactivement (Fig 23). Par rapport au témoin maintenu à l'air,

l'application d'éthylène exogène stimule l'expression du gène *PA-ACO* dès le stade In1 (92 JAA). L'effet inducteur de l'éthylène est d'autant plus important que l'état de maturité du fruit est avancé. Il est significatif dès que le fruit a acquis son aptitude à mûrir. A un stade de maturation équivalent, le 1-MCP inhibe l'expression du gène *PA-ACO*, ce qui se traduit par une diminution du taux de transcrite. Cet effet se produit dès le stade In1 et se poursuit tout au long de la maturation. L'effet inhibiteur du 1-MCP est plus important au stade mi-mûr où une diminution importante (de l'ordre de 100 fois) du niveau des transcrits *PA-ACO* est observée par rapport au témoin laissé à l'air. Ces résultats démontrent clairement que, tout comme chez d'autres fruits, l'expression du gène *PA-ACO* est sous le contrôle de l'éthylène autocatalytique. Dès lors, il est raisonnable de penser que l'inhibition du gène *PA-ACO* par le CO<sub>2</sub> se fasse via son interférence sur le mode action de l'éthylène. Le profil d'expression du gène d'ACC oxydase *PA-ACO* chez les fruits traités à l'éthylène et au 1-MCP montre que, tout comme le gène *PA-ACS2*, il est associé à l'éthylène autocatalytique.

Il est généralement admis que l'ACC synthase est limitante dans le schéma de biosynthèse de l'éthylène liée à la maturation des fruits (Yang et Hoffman, 1984, Yang et Dong, 1993 ; Zarebinski et Theologis, 1994 ; Flühr et Mattoo, 1996). Chez l'abricot, ce rôle limitant est probablement tenu par le produit du gène *PA-ACS2*. Chez Monique, l'expression de ce dernier, liée à la synthèse autocatalytique de l'éthylène, est plus sensible à l'hormone comparée à celle du gène *PA-ACO*. Une expression basale de *PA-ACO* précède l'émission d'éthylène alors que *PA-ACS2* n'est exprimé que lorsque le fruit émet de l'éthylène. L'application de l'éthylène exogène induit l'expression de *PA-ACO* de manière plus importante que celle de *PA-ACS2* lequel, contrairement à *PA-ACO*, est totalement inhibé en présence du 1-MCP. De plus, si l'on considère le niveau d'expression du gène chez Bergeron et Monique, il est concevable de penser qu'il soit en partie à l'origine de la différence d'émission d'éthylène observée entre les deux variétés. Un tel cas de figure a également été observé chez deux variétés de kiwi et de melon. Chez chacune de ces espèces, la différence d'émission d'éthylène observée entre deux variétés a été associée à une induction différentielle du gène d'ACC synthase spécifique de la phase climactérique (*KW-ACC1* pour le kiwi et *CM-ACS1* pour le melon) (Xu *et al.*, 1998; Shiomi *et al.*, 1999).

### **II - 3 - Accumulation de la protéine ACC oxydase**

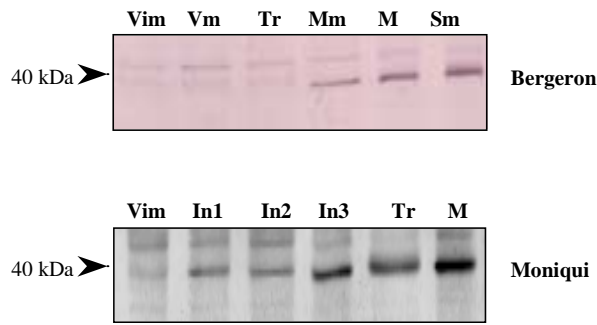
Les résultats précédents ont clairement démontré une régulation du gène d'ACC oxydase *PA-ACO* par l'éthylène de la maturation. Nous avons également démontré que le développement du fruit est associé à la régulation du gène *PA-ACO*. De récentes études ont

mis en évidence le rôle clé de la transcription dans le mécanisme de régulation du gène d'ACC oxydase (Peck et Kende, 1995 ; Barry *et al.*, 1996 ; Jin *et al.*, 1999). Afin de vérifier cette hypothèse en relation avec l'éthylène de la maturation du fruit et son développement, le profil d'expression de la protéine ACC oxydase a été étudié et comparé à celui des ARNm *PA-ACO*. Pour ce faire, la technique de détection immunochimique de protéines a été utilisée. L'anticorps dirigé contre la protéine ACC oxydase de tomate a été synthétisé chez le lapin (Dupille *et al.*, 1993). Il a été utilisé comme anticorps primaire et l'anticorps anti-IgG de lapin conjugué à la phosphatase alcaline comme anticorps secondaire.

### II - 3 - 1 - Accumulation de la protéine ACC oxydase pendant le développement du fruit sur l'arbre

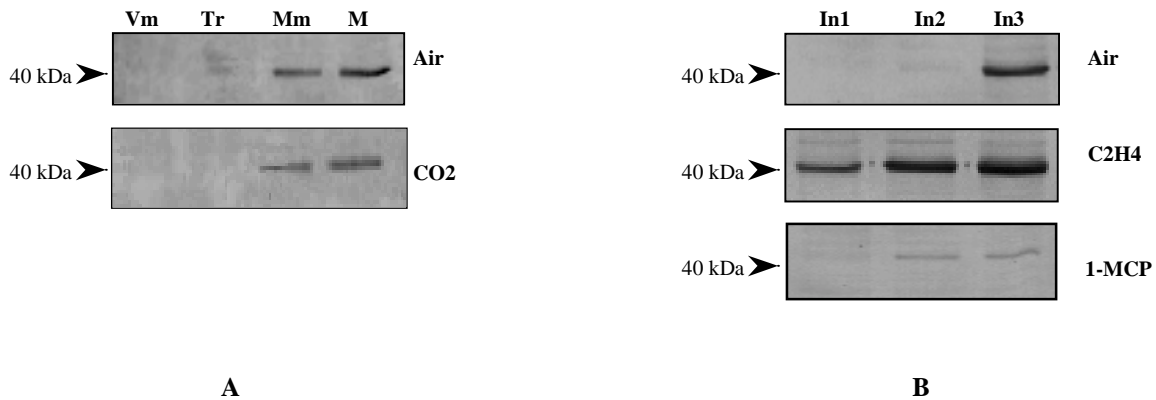
Le détection immunochimique de la protéine ACC oxydase a été réalisée sur les protéines totales d'abricot Bergeron et Moniqui, extraites à différents stades de maturation sur l'arbre et après des traitements post-récolte (Fig. 24 et 25).

Chez les deux variétés, une protéine majeure d'environ 40 kDa ainsi que d'autres d'intensité plus faible sont détectées (Fig. 24). La masse moléculaire de cette protéine est similaire à celle du polypeptide déduit de l'ADNc *PA-ACO* et caractéristique des protéines ACC oxydase purifiées chez d'autres espèces (Kende, 1993 ; Theologis et Zarembinski, 1994 ; Flühr et Mattoo, 1996). Par ailleurs, en faisant réagir cet anticorps avec l'ACC oxydase purifiée de tomate, Lelièvre *et al.*, (1995) ont démontré que, chez la poire, les signaux de faibles intensités sont des artefacts résultant d'une reconnaissance aspécifique de l'anticorps hétérologue anti-ACC oxydase de tomate, alors que la protéine de 40 kDa n'est plus détectée. Cette dernière, peut de ce fait être assimilée à la protéine ACC oxydase. Le profil d'accumulation de cette protéine est similaire chez les deux variétés Bergeron et Moniqui en maturation sur l'arbre. Elle est détectée dès le stade vert immature. Son taux est basal dans les premiers stades de la maturation ; Vim, Vm et Tr chez Bergeron ; Vim, In1, In2 chez Moniqui. La protéine s'accumule abondamment et progressivement dans les phases tardives de la maturation ; Vim, Vm et Tr chez Bergeron ; Vim, In1, In2 chez Moniqui. Cette accumulation est plus abondante chez la variété Moniqui que chez Bergeron. Le profil d'expression de la protéine ACC oxydase au cours de la maturation du fruit d'abricot Bergeron et Moniqui sur l'arbre est similaire à l'accumulation de transcrits *PA-ACO* et au dégagement éthylénique (Fig. 24, 21, 3). Ce qui renforce l'hypothèse que la protéine de 40 kDa soit assimilée à l'ACC oxydase.



**Figure 24 :** Accumulation de la protéine ACC oxydase d'abricot pendant la maturation du fruit sur l'arbre.

Les protéines totales sont extraites des fruits Bergeron et Monique en maturité sur l'arbre. Les stades de maturation utilisés sont : Vim (vert immature), Vm (vert mature), Tr (tournant), Mm (mi-mûr), M (mûr) et Sm (sur-mûr) pour Bergeron et vert immature (Vim), In 1 (inductible 1), In 2 (inductible 2), In 3 (inductible 3), Tr (tournant) et M (mûr) pour Monique. Les protéines totales (10 µg) sont séparées par électrophorèse SDS-PAGE et transférées sur une membrane de nitrocellulose. La protéine ACC oxydase est ensuite détectée par immunochimie avec l'anticorps anti ACC oxydase de tomate (Dupille *et al.*, 1993).



**Figure 25 :** Effet des traitements post-récoltes sur l'accumulation de la protéine ACC oxydase d'abricot.

Les protéines totales sont extraites des fruits Bergeron (A) et Monique (B) traités respectivement au CO<sub>2</sub>, à l'éthylène et au 1-MCP. Les stades de maturation utilisés sont : Vim (vert immature), Vm (vert mature), Tr (tournant), Mm (mi-mûr), M (mûr) et Sm (sur-mûr) pour Bergeron et In1 (inductible 1), In2 (inductible 2) et In3 (inductible 3) pour Monique. Les protéines totales (10 µg) sont séparées par électrophorèse SDS-PAGE et transférées sur une membrane de nitrocellulose. La protéine ACC oxydase est ensuite détectée par immunochimie avec l'anticorps anti ACC oxydase de tomate (Dupille *et al.*, 1993).

### II - 3 - 2 - Effet des traitements post-récoltes sur l'expression de la protéine ACC oxydase

Chez Bergeron, aussi bien pour le fruit traité au CO<sub>2</sub> que chez le témoin laissé à l'air, la protéine ACC oxydase n'est détectée qu'aux stades mi-mûr et mûr où commencent à s'accumuler les transcrits *PA-ACO*. Le CO<sub>2</sub> réduit sensiblement l'accumulation de la protéine ACC oxydase. Cet effet inhibiteur est plus significatif au stade mi-mûr (Fig. 25A). Chez Monique, l'éthylène induit l'accumulation de la protéine ACC oxydase aux stades In1, mais pas l'air, de la même manière que les ARNm *PA-ACO*. Par rapport aux témoins laissés à l'air, l'éthylène induit l'accumulation abondante de la protéine *PA-ACO* aux stades In2 et In3 alors que le 1-MCP l'inhibe (Fig. 25B). Aussi bien chez Bergeron que chez Monique, les traitements post-récolte du fruit induisent une accumulation de la protéine ACC oxydase similaire à celle des transcrits *PA-ACO*.

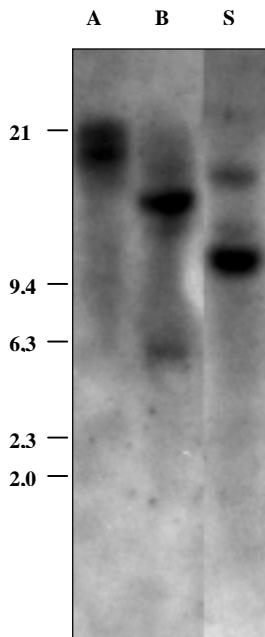
Pour les deux variétés mûries sur l'arbre ou après des traitements post-récolte, une corrélation positive et directe est observée entre les profils d'accumulation des messagers *PA-ACO* et de la protéine ACC oxydase. Ce résultat, qui corrobore ceux obtenus chez d'autres tissus (Peck et Kende, 1995 ; Barry *et al.*, 1996 ; Jin *et al.*, 1999), suggère que le gène d'ACC oxydase, *PA-ACO*, d'abricot est probablement régulé au niveau transcriptionnel. Le rôle clé de la transcription dans le mécanisme de régulation du gène d'ACC oxydase a été définitivement démontré chez la tomate où l'activité enzymatique ACC oxydase a été mesurée. Son profil d'augmentation est également positivement et directement corrélé à ceux des messagers et de la protéine ACC oxydase (Barry *et al.*, 1996 ; Nakatsuka *et al.*, 1997). Chez l'abricot, l'activité ACC oxydase n'a, pour l'instant, pas été mesurée. De plus, aucun mécanisme post-traductionnel susceptible d'influencer l'activité de l'enzyme n'a jamais été démontré. De ce fait, il est raisonnable d'envisager une corrélation positive et directe entre l'accumulation des ARNm et celle de la protéine *PA-ACO*, comme c'est le cas chez d'autres espèces, avec en conséquence une régulation transcriptionnelle de ce gène.

### II - 4 - Complexité du gène *PA-ACO* dans le génome d'abricot Bergeron

L'ACC oxydase est codée par une famille multigénique moins importante que celle d'ACC synthase. Quatre de ses membres ont été identifiés chez la tomate et le pétunia (Barry *et al.*, 1996 ; Nakatsuka *et al.*, 1998 ; Tang *et al.*, 1993), et trois chez le melon (Lasserre *et al.*, 1996). La complexité du gène d'ACC oxydase dans le génome d'abricotier a



été analysée afin d'évaluer le nombre de gènes apparentés au gène d'ACC oxydase, *PA-ACO*. L'ADN extrait de jeunes feuilles d'abricot Bergeron est digéré par les enzymes *Apa* I, *Bam*H I et *Sac* I. Les fragments d'ADN transférés sur une membrane sont hybridés à faible stringence avec l'ADNc complet *PA-ACO* marqué radioactivement. La membrane est ensuite lavée à faible stringence pendant 40 min à 40°C, et 10 min à 45°C (tableau 4). La digestion de l'ADN par l'enzyme *Apa* I révèle deux bandes majeures (Fig. 26). Lorsque l'ADN est digéré avec les enzymes *Bam*H I et *Sac* I, une bande majeure est révélée sur chaque piste. En plus de celle-ci, respectivement 3 et 2 fragments génomiques faiblement reconnus par la sonde d'ACC oxydase sont également révélés sur les pistes *Bam*H I et *Sac* I. L'ADNc *PA-ACO* ne disposant pas des sites de restriction des enzymes *Apa* I, *Bam*H I et *Sac* I, la taille et l'intensité des fragments génomiques hybridés suggèrent, qu'en plus du gène *PA-ACO*, au moins deux autres gènes présents dans le génome d'abricot lui sont apparentés.



**Figure 26 : Complexité du gène *PA-ACO* chez l'abricot par hybridation moléculaire des fragments d'ADN.**

L'ADN génomique d'abricot est digéré par les enzymes *Apa* I (piste A), *Bam*H I (piste B), *Sac* I (piste S). Transférés sur une membrane, les fragments d'ADN sont hybridés avec l'ADNc complet *PA-ACO* marqué radioactivement. L'ADN du bactériophage  $\lambda$  digéré par l'enzyme *Hind* III est utilisé comme marqueur de masse moléculaire.

### **III - LE GENE *p69RF* D'ABRICOT**

Le gène *p69RF* est l'un des nombreux gènes isolés aléatoirement chez l'abricot. La protéine *p69RF* présente une forte homologie avec la protéine *2A6* d'*Arabidopsis* et *E8* de la tomate (Fig. 12). Le rôle des protéines *2A6* et *E8* n'est, pour l'instant, pas connu chez les plantes. Cependant, de récentes études ont suggéré l'implication de la protéine *E8* dans le mécanisme d'autoinhibition de l'éthylène. Excepté chez la tomate, le gène *E8* a été très peu étudié chez d'autres fruits en relation avec leur processus de maturation d'où sa caractérisation chez l'abricot. Pour ce faire, l'ADNc partiel *p69RF*, marqué radioactivement, a été utilisé comme sonde pour hybrider, dans les conditions standards, les ARN totaux extraits

des abricots Bergeron et Moniqui à différents stades de maturité sur l'arbre et après des traitements post-récolte. Les membranes ont été lavées dans les conditions identiques à celles utilisées lors de la caractérisation du gène *PA-ACO*.

### **III - 1 - Expression du gène *p69RF* pendant le développement du fruit sur l'arbre**

Les ARNm *p69RF* sont détectés dès le stade vert mature chez la variété Bergeron, et inductible chez la variété Moniqui, alors qu'aucune trace d'éthylène n'est détectée (Fig. 27). Chez Bergeron, ces ARN s'accumulent progressivement entre le stade vert mature et le stade mûr pour lequel le maximum d'expression est atteint. Le taux d'ARNm *p69RF* commence à décroître sensiblement au stade sur-mûr. Un profil similaire de l'expression du gène *p69RF* est obtenu chez Moniqui mais, dans ce cas, le maximum d'expression du gène est observé au stade inductible 3. Le polypeptide correspondant au gène *p69RF* est homologue à la protéine *E8*. La fonction de la protéine *E8* n'est pour l'instant pas connue mais son implication dans le mécanisme d'autoinhibition de la biosynthèse de l'éthylène a été démontrée. Chez la tomate, la surexpression de la protéine *E8* ou l'inhibition du gène correspondant s'accompagne respectivement d'une baisse ou d'une augmentation du taux d'éthylène émis (Penarrubia *et al.*, 1992 ; Kneissl et Deikman, 1996). La quantité de transcrits *p69RF* a été mesurée à l'aide du logiciel ImageQuant (Molecular Dynamics). Son évolution indique que l'expression du gène *p69RF* est négativement corrélée à la quantité d'éthylène émise par les deux variétés. Le taux d'ARNm *p69RF* est en moyenne 3 fois plus élevé chez Bergeron, qui produit moins d'éthylène, que chez Moniqui (Fig. 28A, B, et C). Par ailleurs, chez les deux variétés, l'absence d'éthylène dans les premières phases de la maturation corrobore l'augmentation de l'expression du gène *p69RF* alors que celle-ci est réduite dans les phases tardives où le taux d'éthylène augmente.

Nous avons précédemment proposé que la différence d'expression du gène d'ACC synthase *PA-ACS2* chez Bergeron et Moniqui, enzyme limitante de la biosynthèse de l'éthylène, soit en partie à l'origine de la différence d'émission d'éthylène observée entre les deux variétés. Compte tenu du profil d'expression du gène *p69RF* pendant la maturation du fruit sur l'arbre et de son homologie de séquence avec le gène *E8* de tomate, il est raisonnable de considérer la différence d'expression du gène *p69RF* comme un élément d'explication supplémentaire en faveur de la différence d'émission d'éthylène observée entre les variétés Bergeron et Moniqui. Ceci mettrait en avant une similarité de fonction entre les protéines *p69RF* d'abricot et *E8* de tomate.

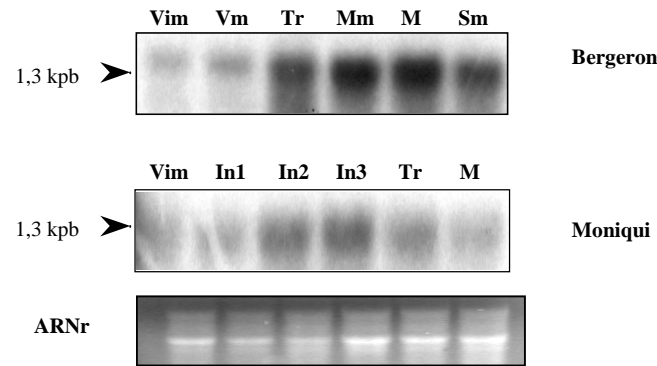


Figure 27 : Expression du gène *p69RF* chez les fruits Bergeron et Moniqui en maturité sur l'arbre.

Les ARN totaux extraits des fruits d'abricot Bergeron et Moniqui pris à 6 stades de développement différents sont séparés sur un gel d'agarose et transférés sur une membrane de nylon. L'ADNc partiel *p69RF* marqué radioactivement a été utilisé comme sonde pour hybrider les ARN totaux. Les stades de maturation utilisés sont Vim (vert immature), Vm (vert mature), Tr (tournant), Mm (mi-mûr), M (mûr) et Sm (sur-mûr) pour Bergeron et Vim (vert immature), In1 (inductible 1), In2 (inductible 2) et In3 (inductible 3), Tr (tournant) et M (mûr) pour Moniqui.

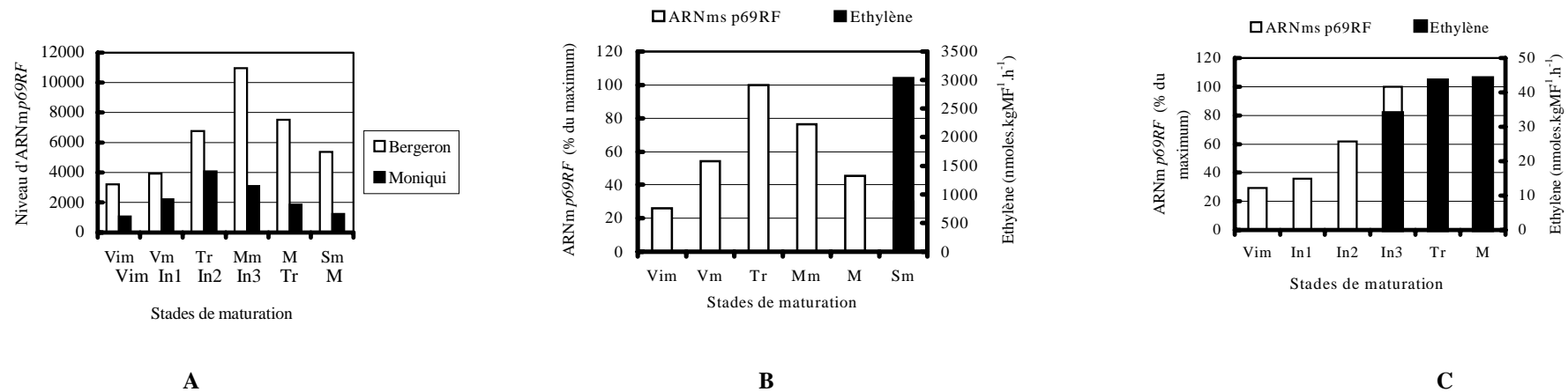


Figure 28 : Evolution quantitative des ARNm *p69RF* et de l'éthylène pendant la maturation des fruits Bergeron et Moniqui sur l'arbre.

Les transcrits *p69RF* ont été quantifiés à l'aide du logiciel ImageQuant (Molecular dynamics, France). L'évolution de ces transcrits est comparée chez Bergeron et Moniqui en maturité sur l'arbre (A) et aux niveaux d'éthylène émis par chacune des variétés Bergeron (B) et Moniqui (C). Les stades de maturation utilisés sont Vim (vert immature), Vm (vert mature), Tr (tournant), Mm (mi-mûr), M (mûr) et Sm (sur mûr) pour Bergeron et Vim (vert immature), In1 (inductible 1), In2 (inductible 2) et In3 (inductible 3), tournant (Tr) et Mûr (M) pour Moniqui.

### **III - 2 - Effet des traitements post-récolte du fruit sur l'expression du gène *p69RF***

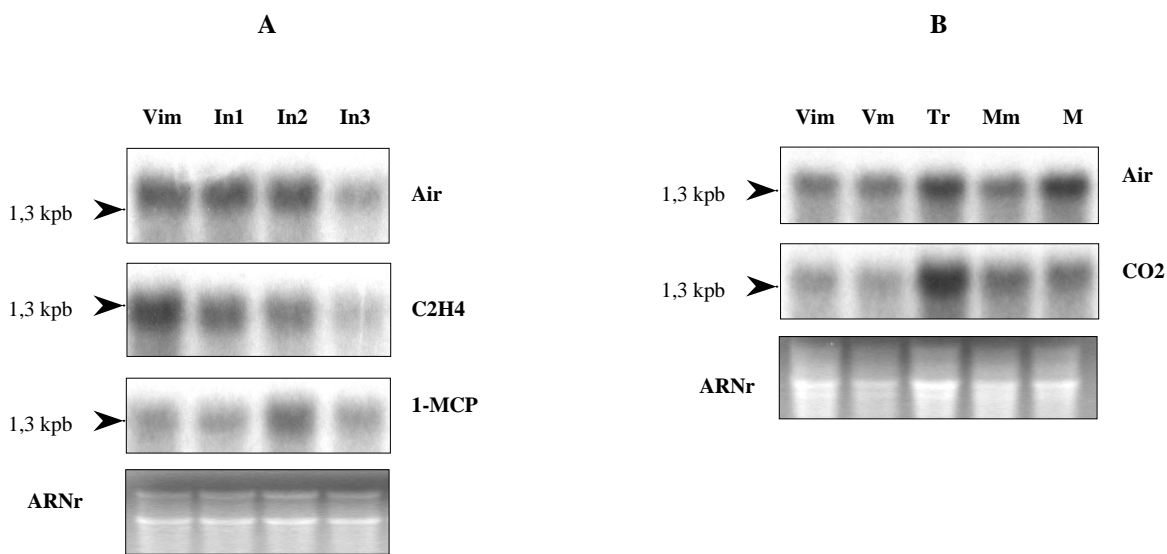
Les résultats précédents ont indiqué une corrélation négative entre l'expression du gène *p69RF* et le dégagement éthylénique. Si ce résultat suppose un rôle similaire entre le gène *p69RF* d'abricot et le gène *E8* de tomate, le profil d'expression du gène *p69RF* peut également indiquer une inhibition du gène *p69RF* par l'éthylène ou par d'autres facteurs associés à la maturation. Nous avons étudié le rôle de l'éthylène et du développement du fruit dans la régulation du gène *p69RF*. Pour cela, l'expression du gène *p69RF* a été analysée par hybridation moléculaire des ARN totaux extraits des fruits traités au CO<sub>2</sub>, à l'éthylène et au 1-MCP (Fig. 29).

#### **III - 2 - 1 - Effet de l'éthylène et du 1-MCP sur l'expression du gène *p69RF* d'abricot**

Les ARN totaux extraits d'abricots Monique aux stades Vim, In1, In2 et In3 transférés sur une membrane sont hybridés avec l'ADNc partiel *p69RF* marqué radioactivement, après un transfert sur une membrane (Fig. 29A). Chez le fruit Vim, donc inapte à mûrir, l'application d'éthylène exogène induit l'expression du gène *p69RF* alors que le 1-MCP l'inhibe. Mais cette baisse du niveau d'ARNm *p69RF* chez le fruit Vim ne peut pas être le résultat d'une action de l'éthylène puisque qu'on est en phase préclimactérique. Si l'on compare l'expression du gène *p69RF* à celui du gène d'ACC oxydase par exemple, ce résultat indique que l'expression du gène *p69RF* est plus associée au niveau d'éthylène endogène du fruit indépendamment de son stade de développement. Par ailleurs, si l'on considère la similarité de fonction entre les produits du gène *p69RF* et *E8*, il est concevable que le gène soit induit chez le fruit immature donc préclimactérique exposé à l'éthylène exogène, afin de maintenir l'éthylène endogène à un taux basal confirmant ainsi son rôle potentiel dans la régulation du niveau d'éthylène endogène. Le comportement du gène *p69RF* chez le fruit climactérique qui produit plus d'éthylène tend à confirmer la précédente hypothèse.

Dans la phase climactérique du développement du fruit, les transcrits *p69RF* diminuent progressivement chez les fruits pris aux stades In1, In2 et In3, et laissé à l'air. Aux mêmes stades de maturité, l'application de l'éthylène exogène accélère la diminution du taux des transcrits du gène par rapport au fruit laissé à l'air. Quant au 1-MCP, il tend à induire légèrement l'expression du gène dans les stades In2 et In3. Ce résultat peut effectivement suggérer une inhibition du gène *p69RF* par l'éthylène contrairement à son homologue *E8* chez la tomate. De ce fait, il ne s'agirait donc pas chez l'abricot d'une autoinhibition de la

biosynthèse de l'éthylène comme c'est le cas chez la tomate avec la protéine E8. Cependant, si l'on compare le profil d'expression du gène *p69RF* à celui du gène *PA-ACO* ou *PA-ACS2*, il semblerait que le gène *p69RF* soit moins sensible à l'éthylène que ne l'est *PA-ACO* ou *PA-ACS2*. Ce qui expliquerait le fait qu'au stade In1, le 1-MCP n'induit pas, comme attendu, l'expression du gène de manière plus importante que chez les fruits traités à l'éthylène ou maintenu à l'air.



**Figure 29 :** Effet des traitements post-récoltes des fruits Moniqui (A) et Bergeron (B) sur l'expression du gène *p69RF*.

Les ARN totaux sont extraits des fruits Moniqui (A) traités à l'éthylène et au 1-MCP, et Bergeron (B) traités au CO<sub>2</sub>. Les stades de maturation utilisés sont : Vim (vert immature), Vm (vert mature), Tr (tournant), Mm (mi-mûr), M (mûr) et Sm (sur-mûr) pour Bergeron et vert immature (Vim), In1 (inductible 1), In2 (inductible 2) et In (inductible 3), tournant (Tr) et Mûr (M) pour Moniqui. Les ARN (15 µg) séparés par électrophorèse sont transférés sur une membrane de nylon et hybridés avec l'ADNc *p69RF* marqué radioactivement.

### III - 2 - 2 - Effet du CO<sub>2</sub> sur l'expression du gène *p69RF* d'abricot

Les fruits Bergeron stockés sous une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> ont été utilisés pour analyser l'effet du développement du fruit sur l'expression du gène *p69RF*. Le gène partiel *p69RF* marqué radioactivement a été utilisé comme sonde pour hybrider les ARN totaux des fruits aux stades vert immature, vert mature, tournant, mi-mûr et mûr (Fig. 29B).

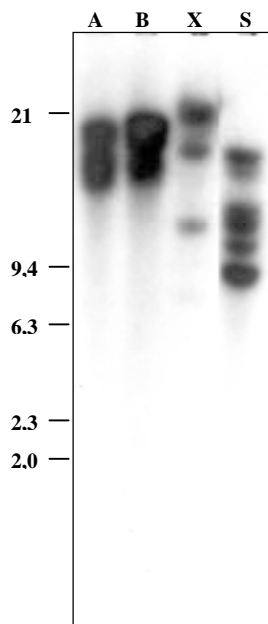
Aussi bien chez le témoin laissé à l'air que chez les fruits traités, les transcrits *p69RF* sont détectés dès le stade vert immature. Leur taux augmente progressivement jusqu'au stade tournant où il atteint son maximum avant de décroître au stade mi-mûr et mûr. L'évolution quantitative des transcrits *p69RF* a été mesurée à l'aide du logiciel ImageQuant (Molecular dynamics). A stade de maturité équivalent, aucune différence quantitative et significative n'est observée entre les taux d'ARNm *p69RF* accumulés chez les fruits témoins laissés à l'air et ceux traités au CO<sub>2</sub>. Ce résultat minimise l'effet d'autres facteurs développementaux sur l'expression du gène *p69RF*. Par conséquent, il met en avant l'hypothèse que nous avons proposée précédemment et selon laquelle la régulation de l'expression du gène *p69RF* pendant la maturation du fruit sur l'arbre est exclusivement due à l'éthylène.

### III - 3 - Complexité du gène *p69RF* dans le génome d'abricot Bergeron

Les premières données sur la complexité des gènes *2A6* et *E8*, homologues au gène *p69RF*, sont controversées. Chez la tomate, le gène *E8* fait partie d'une famille multigénique d'au moins trois membres (Deikmann et Fischer, 1988) alors que son homologue *2A6* chez *Arabidopsis* est monogénique (Trentmann et Kende, 1995). L'ADN d'abricot Bergeron digéré par les enzymes *Apa* I, *Bam*H I, *Xho* I et *Sac* I est transféré sur une membrane. Dans les conditions d'hybridation et de lavages identiques à celles décrites pour le gène *PA-ACO*, plusieurs fragments d'ADN de taille supérieure ou égale à 9 kpb sont révélés, ceci quelle que soit l'enzyme de restriction utilisée (Fig. 30). D'après la carte de restriction, aucun site de coupure des enzymes utilisées n'est présent dans la séquence du gène *p69RF*. La taille et le nombre des fragments d'ADN génomique hybridés suggèrent que le gène *p69RF* fait partie d'une famille multigénique tout comme le gène *E8* de tomate.

Le gène *p69RF* présente des similitudes à la fois avec les gènes *E8* de tomate et *2A6* d'*Arabidopsis*. Ils codent tous les trois pour des dioxygénases de type 2-oxaloglutarate-dépendant et sont régulés par l'éthylène d'où la similarité de fonction qu'il est logique d'attribuer à leur protéine respective. Cependant, chez les plantes supérieures, certaines

dioxygénases de type 2-oxaloglutarate-dépendant peuvent être impliquées aussi bien dans les métabolismes secondaires que dans la synthèse d'hormones végétales telles que l'acide abscissique ou les gibbérélines (Deikman et Fischer, 1988 ; Prescott et John, 1996). Nous avons précédemment démontré que chez l'abricot le gène *p69RF* fait partie d'une famille multigénique. Il est donc possible que le produit de ce gène, bien qu'homologue à la protéine *E8* de tomate, soit impliqué dans un processus physiologique autre que la biosynthèse de l'éthylène. Nos résultats n'excluent pas l'existence chez l'abricot d'un gène plus similaire à *E8* que ne le serait le gène *p69RF* et qu'il faudrait rechercher par criblage de banque.



**Figure 30 :** Complexité du gène *p69RF* chez l'abricot par hybridation moléculaire des fragments d'ADN.

L'ADN génomique d'abricot est digéré par les enzymes *Apa* I (piste A), *Bam*H I (piste B), *Xho* I (piste X) et *Sac* I (piste S). Transférés sur une membrane, les fragments d'ADN sont hybridés avec l'ADNc partiel *p69RF* marqué radioactivement. L'ADN du bactériophage  $\lambda$  digéré par l'enzyme *Hind* III est utilisé comme marqueur de masse moléculaire.

## **Caractérisation des gènes impliqués dans d'autres métabolismes**

### **I – LES GENES IMPLIQUES DANS LA PERTE DE FERMETE**

#### **I – 1 - Présentation**

La perte de fermeté est le deuxième aspect de la maturation de l'abricot auquel nous nous sommes intéressés. Nous avons recherché les gènes codant pour les hydrolases pariétales dont les activités, au cours de la maturation de certains fruits, ont été associées à leur perte de fermeté (pectinéméthylestérase, polygalacturonase, cellulase, xyloglucan endotransférase et  $\beta$ -galactosidase). Seuls des fragments d'ADNc codant pour la pectinéméthylestérase (*PA-PME*) et la  $\beta$ -galactosidase (*PA- $\beta$ GAL*) ont pu être isolés du fruit par RT-PCR et 3'RACE-PCR. Ces fragments d'ADNc ont été utilisés comme sonde pour étudier l'expression des gènes correspondant au cours de la maturation du fruit. Les membranes ont été hybridées dans les conditions standards et lavées à faible stringence pendant 40 min à 40°C, 20 min à 45°C, et 20 min à 45°C (tableau 4). Dans ces conditions, aucun signal d'hybridation n'a été obtenu dans les tissus de fruit. Cependant, une expression des deux gènes a été observée dans les jeunes feuilles. Ces résultats indiquent que les gènes *PA-PME* et *PA- $\beta$ GAL* sont faiblement exprimés dans le fruit.

L'isolement des gènes du fruit par l'approche aléatoire nous a permis d'obtenir un fragment d'ADNc homologue au gène d'expansine de concombre. Les expansines ont été mises en évidence, pour la première fois, chez les tissus végétaux où leur capacité à induire la croissance a été démontrée (McQueen-Mason *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1993; Keller et Cosgrove, 1995). Cependant, la protéine a récemment été proposée chez la tomate comme étant impliquée dans le métabolisme des parois lié à la perte de fermeté (Rose *et al.*, 1997; Brummell *et al.*, 1999). Ceci explique l'intérêt que nous avons porté à ce fragment d'ADNc, ainsi que son étude plus détaillée pendant la maturation de l'abricot, et en relation avec la perte de fermeté.

Deux ADNc complets, *PA-EXP1* et *PA-EXP2* codant pour deux isoformes d'expansine, ont été isolés par criblage de banque. L'article présenté en annexe 11, décrit l'ensemble des résultats issus de la caractérisation de ces deux clones chez le fruit en maturité sur l'arbre et après des traitements gazeux post-récolte à l'air, au CO<sub>2</sub>, à l'éthylène et au MCP.



*PA-EXP1* et *PA-EXP2* sont codés par deux gènes différents, membres d'une grande famille multigénique. Ils sont différemment régulés par la maturation du fruit, l'éthylène et le CO<sub>2</sub>.

Dans une première analyse, nos résultats obtenus au cours de la maturation sur l'arbre peuvent laisser à penser que l'éthylène pourrait induire les gènes *PA-EXP1* et *PA-EXP2*. Cette hypothèse n'est en fait renforcée ultérieurement que dans le cas de *PA-EXP1*, et seulement lors de traitement à l'air. Au contraire, on constate qu'un traitement par l'éthylène n'a pas d'effet inducteur sur l'expression des deux gènes. De plus, on constate que, lorsque des fruits récoltés précocement sont laissés à l'air, les gènes *PA-EXP1* et *PA-EXP2* sont induits alors qu'il n'y a pas d'émission d'éthylène. De ce fait, l'induction des gènes *PA-EXP1* et *PA-EXP2* observée est plus due à un développement généralisé du fruit qu'à l'éthylène. D'un autre côté, puisque l'expression des deux gènes est réduite lorsque le fruit émet de grandes quantités d'éthylène, et puisque le 1-MCP restore cette expression, nous pouvons faire l'hypothèse que les deux gènes sont négativement régulés par de fortes concentrations en éthylène. Cet effet inhibiteur de l'éthylène est d'ailleurs plus marqué pour *PA-EXP1* que pour *PA-EXP2*.

Il est admis que, chez les fruits climactériques, de fortes concentrations en CO<sub>2</sub> ralentissent le processus de maturation en inhibant la synthèse d'éthylène et son action sur l'expression de gènes liés à la maturation (Burg et Burg, 1967 ; Sisler et Wood, 1988 ; Gorny et Kader, 1996, 1997 ; Rothan *et al.*, 1997). L'effet inhibiteur du CO<sub>2</sub> sur l'expression de *PA-EXP1* et *PA-EXP2* peut ainsi être lié à l'action de ce gaz sur le processus global de maturation.

Bien qu'il paraisse donc peu probable que *PA-EXP1* et *PA-EXP2* soient induits par l'éthylène, ces deux gènes sont toutefois clairement exprimés pendant la maturation et, de surcroît, principalement dans le fruit. Dans cette étude, nous ne sommes pas parvenus à évaluer l'accumulation des protéines correspondantes car nous ne disposons pas d'anticorps spécifiques. Nous n'avons donc pas pu savoir si les protéines continuaient de s'accumuler dans le fruit alors que le nombre de transcrits du gène diminuait ; ce qui renforcerait le rôle potentiel de cette protéine dans le processus de perte de fermeté.

Notons également que, bien que l'abricot soit climactérique, il y a, contrairement à la tomate, superposition des phases de croissance et de maturation. Nous pouvons alors lancer l'hypothèse que, dans ce type de fruit, il pourrait ne pas y avoir de gène d'expansine induit par l'éthylène. Cette hypothèse est à rapprocher des récents résultats obtenus par Civello *et al.* (1999), chez la fraise, un fruit non climactérique où croissance et maturation sont aussi superposées. Ces auteurs ont montré que le gène d'expansine *FA-EXP2*, exprimé au

cours de la maturation, n'est en effet pas affecté par des traitements à l'auxine, contrairement à tous les autres gènes régulés par la maturation chez ce fruit.

Néanmoins, nous avons montré que les deux gènes d'expansine isolés chez l'abricot appartiennent à une famille multigénique. Ce résultat rend toujours possible l'hypothèse selon laquelle un autre gène, dépendant à la fois de la maturation et de l'éthylène, existerait chez l'abricot.

## **II - CARACTERISATION D'AUTRES GENES ISOLEES DU FRUIT**

### **II - 1 - Présentation**

Les gènes codant pour la polyphénoloxydase (*PA-PPO*) et la zéaxanthine époxydase (*PA-ZE*) ont également été caractérisés plus en détail dans cette étude (complexité génique et expression du gène). Chez les plantes, l'activité de la polyphénoloxydase (EC 1.14.18.1) a, de nombreuses fois, été associée aux processus de brunissement, d'abscission des feuilles ou encore à la réponse aux agents pathogènes ou à la blessure (Nicolas *et al.*, 1994 ; Coupe *et al.*, 1997). De plus, chez la banane, la chute de taux des polyphénols, substrat de la polyphénol oxydase a également été associée à la perte de l'astringence du fruit (Mendoza *et al.*, 1994). Quant à la zéaxanthine epoxidase, elle a été très peu étudiée au niveau moléculaire en rapport avec le processus de maturation des fruits climactériques. L'implication de cette enzyme dans le métabolisme des xanthophylles et la biosynthèse de l'acide abscissique a récemment été suggérée chez le tabac (Marin *et al.*, 1996). Chez le poivre (un fruit non climactérique), le gène est induit pendant la différenciation des chloroplastes en chromoplastes (Bouvier *et al.*, 1996). Cependant, on ne sait que très peu de choses, d'une part, sur les caractéristiques du gène de zeaxanthine époxydase chez les fruits climactériques et, d'autre part, sur l'étude moléculaire du brunissement enzymatique par la polyphénoloxydase qui au final, influencent les qualités organoleptiques du fruit. Ceci explique l'intérêt que nous avons porté à ces gènes. En ce qui concerne le gène *PA-PPO*, la caractérisation moléculaire du gène a été complétée par une caractérisation biochimique de la protéine en collaboration avec Florence Forget-Richard et David De Rigal de l'équipe du laboratoire de biochimie des métabolites secondaires.

L'isolement d'autres gènes par la méthode de séquençage systématique ne tient pas compte de leur différence d'expression pendant le développement du fruit. De ce fait, bien qu'étant isolés du fruit mûr, ils n'y sont pas forcément exprimés de manière spécifique. De plus, certains d'entre eux codent pour des protéines dont la fonction chez les plantes est plus ou moins en rapport avec des aspects importants du développement des fruits comme la sénescence (gène de la cystéine protéase *pAPRI52*, n° d'accension U93166), les mécanismes de défense (gène de la protéine allergène *pAPRI35*, n° d'accension U93165, gène de la O-méthyltransférase *pAPRI05*, n° d'accension U82011) ou d'adaptation aux conditions environnementales (gène de la métallothionéine

*pAPRI32* n° d'accèsion U97494, gène de la protéine ASR *pAPRI41*, n° d'accèsion U93164).

Nous avons vérifié l'hypothèse de l'existence d'une association entre le processus de maturation du fruit, l'expression du gène isolé et le métabolisme auquel il serait associé. Pour ce faire, l'expression de certains de ces gènes a été étudiée pendant la maturation de l'abricot Bergeron sur l'arbre. L'ADNc correspondant au gène étudié a été marqué radioactivement puis utilisé comme sonde pour hybrider les ARN totaux extraits de tissus de fruits à différents stades de maturité : vert mature, vert immature, tournant, mi-mûr, mûr et sur-mûr. Les conditions d'hybridation, de préhybridation et de lavage sont les mêmes que celles décrites dans la caractérisation du gène *p69RF*.

Les résultats de caractérisation de ces gènes sont décrits dans les articles présentés en annexes 12, 13, 14, 15, 16 et 17. Ils indiquent que ces gènes sont différemment exprimés pendant la maturation du fruit sur l'arbre. Certains gènes, comme celui de la métallothionéine, sont abondamment exprimés avec un taux de transcrits sensiblement constant tout au long du développement du fruit. Les gènes faiblement exprimés (O-Méthyltransférase, ASR) sont induits, et d'autres (allergène, gène *PA-PPO*) sont réprimés pendant la maturation. La caractérisation des gènes *PA-PPO* et *PA-ZE* confirme la variété des mécanismes de régulation géniques mis en jeu pendant la maturation. L'expression du gène *PA-PPO* est régulée au niveau traductionnel et post-traductionnel alors que celle de *PA-ZE* serait régulée plus au niveau transcriptionnel. Compte tenu des métabolismes variés dans lesquels sont potentiellement impliqués les produits de ces gènes, leur profil d'expression corrobore la complexité du processus de maturation.

***Discussion générale, perspectives et intérêts  
du travail***

## **Discussion générale et perspectives**

L'objectif de cette thèse était de rechercher des marqueurs moléculaires de la maturation de l'abricot, en particulier ceux associés à la biosynthèse de l'éthylène, à la perte de fermeté, et à d'autres métabolismes secondaires (brunissement, synthèse des pigments), en vue d'une utilisation finalisée dans l'amélioration des qualités organoleptiques de ce fruit.

Ce travail a été développé essentiellement sur un aspect moléculaire (isolement et caractérisation des gènes) en appui aux approches physico-chimique et génétique qui ont permis de choisir les modèles d'étude, et de déterminer les critères physico-chimiques les plus discriminants des différents stades de maturation. Il a consisté, d'une part, à isoler de manière spécifique ou aléatoire des gènes exprimés chez le fruit mûr et, d'autre part, à caractériser ces derniers pendant la maturation du fruit sur l'arbre, et après des traitements post-récolte.

Au terme de cette étude, deux principaux résultats ont été obtenus :

\* L'isolement de 45 gènes du fruit d'abricot, tous enregistrés dans la banque de données GenBank. La plupart de ces gènes codent pour des protéines de fonctions connues et impliquées dans des processus physiologiques variés tels que la synthèse hormonale (biosynthèse d'éthylène et d'acide abscissique), la transduction cellulaire du signal, la mobilisation des assimilats (métabolisme des sucres), la sénescence, la défense contre les stress biotique et abiotique, etc...

\* Deux marqueurs moléculaires spécifiques de l'aspect dégagement éthylénique ont pu être identifiés et validés. Il s'agit des gènes *PA-ACS2* et *PA-ACO*. Ils codent pour respectivement pour l'ACC synthase et l'ACC oxydase, les deux enzymes clé de la voie de biosynthèse de l'éthylène.

Plus largement, nos résultats nous ont permis d'aborder les principaux points suivants :

### **La variabilité de l'expression des gènes et des mécanismes de régulation de mise en place pendant la maturation de l'abricot**

Les modifications dans l'expression des gènes constituent l'un des évènements majeurs associés au processus de maturation des fruits. Pendant la maturation de l'abricot, certains gènes sont fortement exprimés (gène de la métallothionéine) et d'autres faiblement. Ces derniers peuvent être induits (gènes d'ACC synthase et d'ACC oxydase) ou réprimés

(gène *PA-PPO*). Ces résultats suggèrent la mise en place des mécanismes de régulation spécifiques d'un gène à l'autre. Un mécanisme de régulation essentiellement transcriptionnelle est envisageable dans le cas du gène *PA-ACO* où l'on observe une évolution de concert entre les ARNm, la quantité de protéine et l'activité de l'enzyme ACC oxydase. La caractérisation du gène *PA-ZE* met en évidence un autre niveau de régulation, cette fois-ci post-transcriptionnelle, vraisemblablement lié à la stabilité de l'ARNm. En effet, les deux ADNc de zéaxanthine époxydase que nous avons isolés sont issus de deux ARNm différents. Ces derniers, également révélés par hybridation moléculaire, sont transcrits à partir d'un gène unique (Mbéguié-A-Mbéguié et Fil-Lycaon, 2000, sous presse). Enfin, avec le gène *PA-PPO*, le niveau de ces ARNm décroît alors que la quantité de protéine PPO, ainsi que l'activité spécifique de l'enzyme, demeurent constantes (Chevallier *et al.*, 1999). Ce qui suggère une forte stabilité de la protéine PPO par conséquent une régulation post-traductionnelle du gène.

### **Le mécanisme moléculaire de la biosynthèse et du mode d'action de l'éthylène chez l'abricot**

Les progrès réalisés dans la caractérisation des gènes d'ACC synthase et d'ACC oxydase de tomate ont permis de proposer des modèles explicatifs de la biologie moléculaire de la biosynthèse de l'éthylène (Oetiker et Yang, 1995 ; Lelièvre *et al.*, 1997). Ils mettent en évidence une discrimination entre les gènes d'ACC synthase et d'ACC oxydase exprimés dans les phases préclimactérique et climactérique du développement du fruit. La caractérisation détaillée des gènes d'ACC synthase (*PA-ACS1* et *PA-ACS2*) et d'ACC oxydase (*PA-ACO*) nous a permis d'étudier plus en détail la biologie moléculaire de la biosynthèse de l'éthylène chez l'abricot, et de proposer le mécanisme schématisé dans la Fig. 31. La faible quantité d'éthylène émise dans les premiers stades de son développement (phase préclimactérique) par le fruit vert, inapte à mûrir, est liée aux activités des enzymes ACC synthase et ACC oxydase produits, probablement, des gènes *PA-ACS1* et *PA-ACO*. Lorsque le fruit acquiert l'aptitude à mûrir, l'éthylène « prend en main » le contrôle de sa propre synthèse en induisant l'expression des gènes *PA-ACS2* et *PA-ACO*, et probablement négativement celle du gène *PA-ACS1*. Ceci a pour conséquence une forte émission autocatalytique d'éthylène, caractéristique majeure des fruits climactériques dont fait partie l'abricot. Ce mécanisme s'apparente, de ce fait, à celui décrit chez la tomate ; avec toutefois une différence d'expression des gènes d'ACC synthase et d'ACC oxydase dans les phases

préclimactérique (*PA-ACS1* et *PA-ACO*) et climactérique (*PA-ACS2* et *PA-ACO*). Chez la tomate et le melon, le gène impliqué dans la phase climactérique a été identifié et caractérisé (Barry *et al.*, 1996, Lasserre *et al.*, 1996). Cependant, le gène d'ACC oxydase *PA-ACO* a un « comportement » différent de ceux de tomate : *LE-ACO1*, et de melon : *CM-ACO1*. En effet, ces derniers sont exprimés dans d'autres tissus de la plante (fleur, feuille, hypocotyle) en réponse à des stress biotique et abiotique (la blessure ou la sénescence) (Barry *et al.*, 1996 ; Lasserre *et al.*, 1996) alors que chez l'abricot, et dans nos conditions d'expérience, *PA-ACO* est spécifique du fruit et insensible à la blessure des jeunes feuilles (Mbéguié-A-Mbéguié *et al.*, 1999, annexe 9). Par ailleurs, chez la tomate et le melon, les gènes *LE-ACO1* et *CM-ACO1* ne s'expriment que lorsque le fruit acquiert l'aptitude à mûrir (Barry *et al.*, 1996 ; Lasserre *et al.*, 1996 ; Nakatsuka *et al.*, 1998 ; Shiomi *et al.*, 1999). Chez l'abricot, les ARNm et la protéine *PA-ACO* sont détectés chez le fruit vert immature. Cependant, compte tenu de nos conditions expérimentales, nous ne pouvons pas associer avec certitude ces signaux d'hybridation à l'expression du gène *PA-ACO*. En effet, les gènes d'ACC oxydase sont fortement conservés dans la partie interne de leurs séquences nucléique et polypeptidique. Lors de nos travaux, l'expression du gène d'ACC oxydase, *PA-ACO*, a été analysée au moyen d'un anticorps hétérologue de tomate et d'une sonde formée de l'ADNc complet *PA-ACO*. De plus, après un lavage en conditions de forte stringence les premiers transcrits *PA-ACO* ne sont détectés chez le fruit qu'au stade tournant. L'utilisation d'une sonde spécifique formée de la partie 3' non codante et spécifique du gène *PA-ACO* et/ou des conditions d'hybridation plus stringente permettra de lever l'ambiguïté.

Suite aux progrès réalisés dans le domaine de la biologie moléculaire de la biosynthèse de l'éthylène, on estime que c'est la différence d'expression des gènes d'ACC synthase et d'ACC oxydase qui est à l'origine de la différence d'émission d'éthylène observée pendant la maturation du fruit. Dans la compréhension du mécanisme moléculaire de la biosynthèse de l'éthylène chez l'abricot, si l'aspect synthèse autocatalytique semble bien avancée avec la caractérisation des gènes *PA-ACS2* et *PA-ACO*, il serait intéressant de rechercher et de caractériser ceux spécifiques de la phase préclimactérique. Dans le cas de l'ACC synthase, on pourrait déjà s'intéresser au gène *PA-ACS1*. En ce qui concerne l'ACC oxydase, le gène *PA-ACO* pourrait être utilisé comme sonde homologue pour cribler la banque d'ADNc de fruit vert et isoler le gène spécifique de la phase préclimactérique.

Nous avons également mis en avant l'importance de la sensibilité tissulaire à l'éthylène dans l'induction différentielle des gènes d'ACC synthase et d'ACC



oxydase. On sait aujourd'hui que cette sensibilité repose sur l'expression des protéines membranaires, récepteurs de l'éthylène. L'étude moléculaire de ces protéines pourrait être envisagée en relation avec le processus de maturation de l'abricot. De nombreux gènes codant pour ces récepteurs ont déjà été clonés chez d'autres espèces. Ils sont très conservés dans leur partie interne. De ce fait, une stratégie de clonage par RT-PCR avec des amorces dégénérées et criblage de banque, peut être envisageable chez l'abricot pour isoler les gènes codant pour les récepteurs d'éthylène.

### **Le processus de perte de fermeté lié à la maturation de l'abricot**

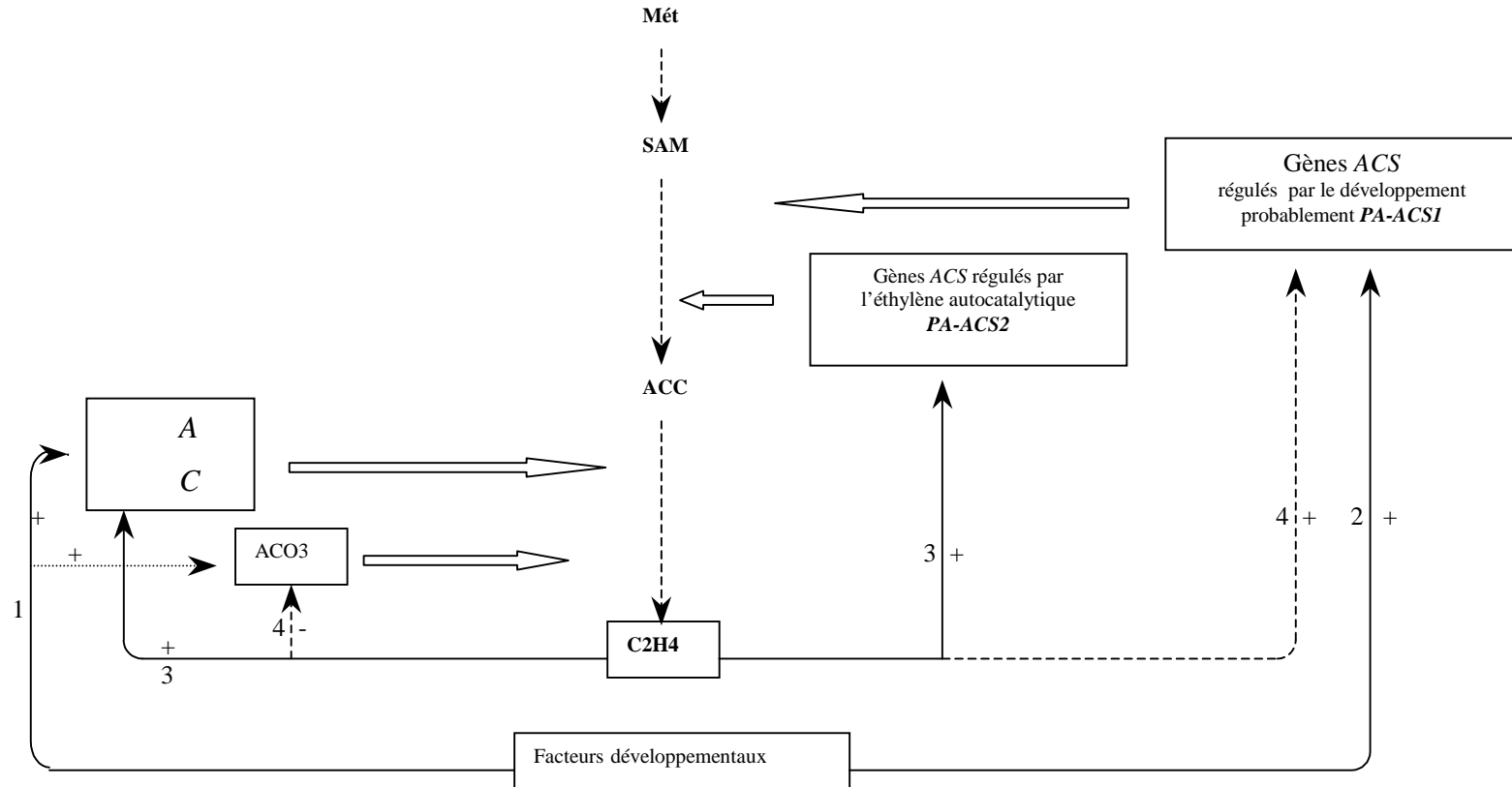
La perte de fermeté du fruit est un processus complexe. Elle met en jeu de nombreuses enzymes (polygalacturonase, pectinéméthylestérase, cellulase,  $\beta$ -galactosidase et autres glycosidases) qui agissent de concert dans la dégradation des parois, principal métabolisme responsable de la perte de fermeté. La technique de transgénèse a définitivement démontré qu'aucune de ces enzymes n'est exclusivement responsable de la perte de fermeté (Sheehy *et al.*, 1988 ; Giovannoni *et al.*, 1989 ; Hall *et al.*, 1993 ; Lashbrook *et al.*, 1998b). Dès lors, d'autres enzymes et mécanismes physiologiques ont été envisagés et recherchés. Nos résultats confirment la complexité du processus de la perte de fermeté. Les seuls gènes codant pour les hydrolases pariétales «classiques» que nous avons pu isoler par RT-PCR sont ceux de  $\beta$ -galactosidase et de pectinéméthylestérase et sont, qui plus est, très faiblement exprimés. Par ailleurs, plusieurs conditions de RT-PCR différentes ont été utilisées sans succès pour isoler les gènes codant pour d'autres hydrolases pariétales connues telles que la cellulase, la polygalacturonase et la xyloglucane endotransférase. Cela suggère que chez l'abricot :

\* Les hydrolases pariétales dites «classiques» (polygalacturonase, pectinéméthylestérase, cellulase,  $\beta$ -galactosidase) sont très faiblement représentées mais leur action agoniste suffirait à provoquer la perte de fermeté du fruit. Dans ce cas des techniques de RT-PCR et hybridation moléculaire pourraient être envisagées pour étudier l'expression des gènes *PA-PME* et *PA-bGAL* déjà isolés.

\* Il est également possible que la perte de fermeté soit liée à des enzymes différentes des hydrolases pariétales «classiques». En effet, les activités polygalacturonase, cellulase et pectinéméthylestérase n'ont, jusqu'à présent, jamais été mesurées chez l'abricot. De plus, l'évolution des activités des glycosydases récemment analysée chez la variété d'abricot «Boccuccia spinosa» a mis en évidence une prépondérance, plutôt des activités  $\alpha$ -

L-arabinofuranosidase et  $\beta$ -D-xylosidase environ 4 fois supérieures à l'activité  $\beta$ -galactosidase (Cardarelli *et al.*, 1998).

\* Enfin, un mécanisme différent et non enzymatique, plus lié à la perte des propriétés physiques des parois, est envisageable. La paroi des cellules végétale est rigide. Cette rigidité vient de la structure en réseau des principaux composés des parois que sont les fibres de pectine, de cellulose et d'hémicellulose (Carpita et Gibeaut, 1993). La rupture de cette structure en réseau peut causer une perte de la rigidité des parois et par conséquent une augmentation de son élasticité. Cette dernière pouvant prendre part à la perte de fermeté. Nous avons isolé deux gènes (*PA-EXP1* et *PA-EXP2*) codant pour deux isoformes d'expansine. Comparés aux gènes codant pour les hydrolases pariétales « classiques », *PA-EXP1* et *PA-EXP2* sont abondamment exprimés pendant la maturation du fruit. Le mécanisme d'action des expansines *in vivo* n'est, pour l'instant, pas connu. La protéine n'a pas d'activité hydrolitique. Cependant sa capacité à rompre les liaisons d'hydrogène a récemment été démontrée *in vitro* (McQueen-Mason et Cosgrove, 1994). La structure en réseau des parois végétales est liée en partie à la cohésion des fibres de cellulose et d'hémicellulose via les liaisons d'hydrogène. De ce fait, il est possible qu'une telle action des expansines *in vivo* ait pour conséquence d'accroître l'élasticité des parois en plus de favoriser l'accessibilité des polysaccharides pariétaux aux enzymes de dégradation ou de synthèse, deux mécanismes potentiellement associés à la perte de fermeté.



**Figure 31 :** Modèle partiel d'induction séquentielle des gènes d'ACC synthase (*PA-ACS1* et *PA-ACS2*) et d'ACC oxydase (*PA-ACO*) par l'éthylène pendant la maturation de l'abricot.

Ce modèle est établi sur la base de celui proposé par Lelièvre et al., (1997) chez la tomate et représenté en pointillé. Les étapes de ce modèle, validées chez l'abricot, sont représentées en traits pleins. Les gènes qui interviennent chez l'abricot sont indiqués en gras et en italiques. ACO : *ACC* oxydase ; ACS : *ACC* synthase ; Mét : *m*éthionine ; SAM : *S*-*a*dénosyl *m*ethionine ; ACC : 1-*a*minocyclopropane-1-*c*arboxylate *c*yclase. Les nombres représentent l'ordre d'induction des gènes d'ACC synthase et d'ACC oxydase.

## Le CO<sub>2</sub> et la maturation de l'abricot

Il y a longtemps que le CO<sub>2</sub> est utilisé pour prolonger la durée de conservation des fruits après leur récolte. Son effet inhibiteur du développement des fruits après récolte a été mis en évidence dans de nombreux cas de figure (Wankier *et al*, 1970 ; Kader, 1986; Wang, 1990). Chez Bergeron, la seule variété à avoir été traitée au CO<sub>2</sub>, une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> ralentit le développement du fruit (Fig. 3). Des études biochimique et moléculaire ont montré que le CO<sub>2</sub> agit sur le développement du fruit majoritairement via son interférence sur la biosynthèse et le mode d'action de l'éthylène (Burg et Burg 1967, Kader 1986 ; Gorny et Kader 1997 ; Rothan *et al* ; 1997). Chez la variété Bergeron, le CO<sub>2</sub> inhibe l'expression du gène d'ACC oxydase avec une baisse du taux d'ARNm et de protéine (Fig. 22). Une baisse des transcrits du gène d'ACC synthase, *PA-ACS1*, a également été observée. Le CO<sub>2</sub> est également un important cofacteur de l'ACC oxydase (Poneleit et Dilley 1993) dont l'activité n'a pas été mesurée chez les fruits traités au CO<sub>2</sub>. Par ailleurs, les transcrits du gène *PA-ACS2*, dont l'expression est étroitement associée à l'éthylène de la maturation, n'ont pas pu être détectés chez Bergeron. De ce fait, nos résultats ne fournissent que partiellement un argument moléculaire en faveur d'un effet du CO<sub>2</sub> sur la synthèse d'éthylène.

Le mécanisme d'action du CO<sub>2</sub> n'est, pour l'instant, pas connu avec précision. Récemment Rothan *et al.*, (1997) ont proposé une régulation de l'expression des gènes par le CO<sub>2</sub> via des voies dépendante et indépendante de l'éthylène. L'analyse comparée de l'expression d'un certain nombre de gènes chez les fruits traités au CO<sub>2</sub>, à l'éthylène et au 1-MCP a effectivement permis de noter des cas de figure où le CO<sub>2</sub> et l'éthylène agissent de concert (gène *PA-ACO* inhibé par le CO<sub>2</sub>, le 1-MCP mais induit par l'éthylène (Fig. 22 et 23), et d'autres où ils agissent de manière indépendante (gène *p69RF* inhibé par l'éthylène mais pas affecté par le CO<sub>2</sub>, Fig. 29).

## **Intérêt des résultats obtenus au terme de ce travail**

L'intérêt du travail présenté dans ce mémoire vient du fait qu'il a des portées, aussi bien en recherche fondamentale, qu'appliquée.

✱ Identification d'un modèle pour l'étude de la maturation des fruits à noyau

Actuellement, le modèle de choix pour l'étude du processus de maturation est la tomate. L'élucidation des phénomènes physiologiques de la maturation y est aujourd'hui avancée. Par contre, très peu de données existent en ce qui concerne le processus de maturation des fruits à noyau de type climactérique et non climactérique, l'absence d'un modèle caractérisé au niveau moléculaire faisant défaut. Nos résultats constituent une avancée importante dans l'optique de la validation de l'abricot comme le modèle d'étude de la maturation des fruits à noyau climactérique.

✱ Développement de l'expertise et des outils dans le domaine de la maturation de l'abricot

Les différents gènes isolés, ainsi que leur caractérisation actuelle et future, permettront de développer une expertise dans domaine de la maturation de l'abricot, expertise dont sont demandeuses d'autres équipes internationales, Autrichienne et Italienne en particulier. L'équipe italienne, qui travaille actuellement sur la perte de fermeté du fruit liée à la maturation, a d'ailleurs contacté l'INRA-STPV pour développer des coopérations dans le cadre de cette approche.

✱ Fourniture d'outils moléculaires pour assister la sélection de nouvelles variétés d'abricot

La *Station d'Amélioration Génétique des Fruits et Légumes* de l'INRA d'Avignon est actuellement engagée dans un programme d'amélioration de la qualité organoleptique via la création de nouvelles variétés réunissant à la fois d'excellentes qualités gustatives et une évolution post-récolte satisfaisant les délais normaux de commercialisation. Les marqueurs moléculaires validés dans le cadre de ce travail (les gènes *PA-ACS2* et *PA-ACO*) et celui à venir, permettront le suivi de l'hérédité des critères de qualité (composition, métabolites secondaires, émission d'éthylène).

L'effet de l'éclaircissage sur les fruits a déjà été rapportée dans la littérature mais le mécanisme reste inconnu (Agusti *et al.*, 1998). Les marqueurs moléculaires permettront, dans des actions finalisées, de préciser l'incidence des conditions pédo-climatiques et des pratiques culturales (degré d'éclaircissage, charge, fertilisation azotée, etc...) sur les qualités organoleptiques de l'abricot.

Enfin, pour les généticiens de la filière fruit, l'ensemble des gènes isolés, validés ou non comme des marqueurs, peuvent être d'une grande utilité en cartographie dans l'optique d'une amélioration de la qualité des fruits par une meilleure connaissance du génome d'abricot.

✱ Maîtrise de la qualité organoleptique des abricots mis sur le marché.

L'hétérogénéité des abricots du point de vu degré de maturité et qualité organoleptique est liée à la difficulté que rencontrent actuellement les producteurs à déterminer des dates de récoltes commerciales des fruits. Chez le fruit en maturité sur l'arbre, le suivi de l'évolution des marqueurs moléculaires mis en place sera d'une grande utilité dans la détermination objective de dates de récoltes commerciales et, par conséquent, dans l'optimisation des conditions de transport et de conservation des fruits.

***Références bibliographiques***

## Références bibliographiques

**Abbal P** et **Planton G** (1990). La mesure objective de la fermeté des fruits et légumes, un pénétromètre électronique automatique et programmable, le système Pénélaup. -*Infos ctfil* N° **62**: 27-30.

**Acosta M**, **Arnao MB**, **Sanchez-Bravo J**, **Casas JL**, **Vioque B**, **Fernandez-Maculet JC** et **Castellano JM** (1993). In: *Cellular and molecular aspects of the plant hormone ethylene*, **Pech JC**, **Latché A**, **Balagué C** (eds) Kluvert Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands, pp 13-18.

**Agusti M**, **Andreu I**, **Juan M**, **Almela V** et **Zacarias L** (1998). Effects of ringing branches on fruit size and maturity of peach and nectarine cultivars.- *J. Hort Sci. Biotech.* **73**: 537-540.

**Ali ZM**, **Armugam S** et **Lazan H** (1995).  $\beta$ -galactosidase and its significance in ripening mango fruit.- *Phytochemistry* **38**: 1109-1114.

**Ali ZM**, **Ng AY**, **Othman R**, **Goh LY** et **Lazan H** (1998). Isolation, characterisation and significance of papaya  $\beta$ -galactosidase to cell wall modification and fruit softening during ripening.- *Physiol. Plant.* **104**: 105-115.

**Altschul SF**, **Madden TL**, **Schaffer AA**, **Zhang J**, **Zhang Z**, **Miller W** et **Lipman DJ** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs.- *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.

**Ayub RM**, **Guis M**, **Ben Amor M**, **Gillot L**, **Roustan JP**, **Latché A**, **Bouzayen M** et **Pech JP** (1996). Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits.- *Nature Biotechnol.* **14** : 862-866.

**Azuma R**, **Kurata H**, **Adachi M** et **Shimokawa K** (1999). Degreening of *Citrus unshiu* fruit via ethylene-induced soluble chlorophyllase.- *J. Japan Soc. Hort. Sci.* **68**: 558-562.

**Barry CS**, **Blume B**, **Bouzayen M**, **Cooper W**, **Hamilton AJ** et **Grierson D** (1996). Differential expression 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid Oxidase gene family of tomato.- *Plant J.* **9**: 525-535.

**Bengochea T**, **Acaster MA**, **Dodds JH**, **Evans DE**, **Jerie PH** et **Hall MA** (1980). Studies on ethylene binding by cell free preparation from cotyledons of *Phaseolus vulgaris* L. Effects of structural analogues of ethylene and of inhibition.- *Planta.* **148**: 407-411.



- Benichou M, Martinez-Reina G, Romojaro F, Pech JC et Latché A** (1995). Partial purification and properties of a 36 kDa 1-aminocyclopropane-1-carboxylate N malonyl-transferase from mungbean.- *Physiol Plant.* **94** : 629-634.
- Bernatzky R et Tanksley SD** (1986). Genetics of actin-related sequences in tomato.- *Theor. Appl. Genet.* **72**: 314-321.
- Berry AW, Cowan DSC, Harpham NVJ, Hemsley RJ, Novikova GV, Smith AR et Hall MA** (1996). Studies on the possible role of protein phosphorylation in the transduction of the ethylene signal.- *Plant Grow. Reg.* **18**: 135-141.
- Beyer Jr EM** (1976). A potent inhibitor of ethylene action in plants.- *Plant Physiol.* **111**: 268-271.
- Beyer Jr EM** (1987). Ethylene metabolism. In: **Roberts JA et Tucker GA** (eds) *Ethylene and plant development*. Butterwoths, London. pp 125-137.
- Biggs MS, Harriman RW, Handa AK** (1986). Change in gene expression during tomato fruit ripening.- *Plant Physiol.* **81**: 395-403.
- Biles CL, Bruton BD, Russo V et Wall MM** (1997). Characterization of  $\beta$ -galactosidase isozymes of ripening peppers.- *J. Sci. Food Agric.* **75**: 237-243.
- Blecker AB, Kenyon WH, Somerville SC et Kende H** (1986). Use of monoclonal antibodies in the purification and characterization of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid synthase, an anzyme in ethylene biosynthesis.- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 7755-7759.
- Blecker AB** (1991). Genetic analysis of ethylene responses in *Arabidopsis thaliana*.- *Symp. Soc. Exp. Biol.* **45**: 149-158.
- Blecker AB et Schaller GE** (1996). The mechanism of ethylene perception.- *Plant Physiol.* **111**: 653-660.
- Boller T, Herner RC et Kende H** (1979). Assay for and enzymatic formation of an ethylene precursor, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid.- *Planta.* **145**: 293-303.
- Bouvier F, d'Harlingue A, Hugueney P, Marin E, Marion-Poll A et Camara B** (1996) Xanthophyll biosynthesis cloning, expression, functional reconstitution, and regulation of b-cyclohexenyl carotenoid epoxidase from pepper (*Capsicum annum*).- *J. Biol. Chem.* **271**: 28861-28867
- Bouzayen M, Felix G, Latché A, Pech JC et Boller T** (1991). Iron : and essential cofactor for the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene.- *Planta.* **184**: 244-247.

**Bouzayen M, Latché A et Pech JC** (1990). Subcellular localisation of the sites of conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid into ethylene in plant cells.- *Planta* **180** : 175-180.

**Bradford MM** (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding.- *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

**Brummell DA, Harpster MH, Civello PM, Palys JM, Bennett AB et Dunsmuir P** (1999). Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening.- *Plant Cell* **11**: 2203-2216.

**Brown K** (1997). Ethylene and abscission.- *Physiol. Plant.* **100**: 567-576.

**Burbidge A, Grieve T, Terry C, Corlett J, Thompson A, Taylor I** (1997). Structure and expression of a cDNA encoding zeaxanthin epoxidase isolated from a wilt-related tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) library.- *J. Exp. Bot.* **48**: 1749-1750.

**Burg SP et Burg EA** (1967). Molecular requirements for the biological activity of ethylene.- *Plant Physiol.* **42**: 144-152.

**Cabot EL et Beckenbach AT** (1989). Simultaneous editing of multiple nucleic acid and protein sequences with ESEE. - *Cabios* **5**: 233-234.

**Cardarelli MT, Botondi R et Mencarelli F** (1998). Glycosidase activity and quality changes during the postharvest ripening of apricots.- *Italus Hortus* **5**: 5-6.

**Carpita NC et Gibeaut DM** (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants : consistency of molecular structure with the physical properties of the wall during growth.- *Plant J.* **3**: 1-30.

**Carrington CMS et Pressey R** (1996).  $\beta$ -Galactosidase II activity in relation to changes in cell wall  $\beta$ -galactosyl composition during tomato ripening.- *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **121**: 132-136.

**Chahine HMW** (1999). Caractéristiques physiques et physiologiques de l'abricot (*Prunus armeniaca* L.): Hérité et modulation de leur expression par l'éthylène.- *Thèse*. INSA de Toulouse, Spécialité: biologie cellulaire et moléculaire végétale. 184 p.

**Chambroy Y, Souty M, Audergon JM, Jacquemin G et Gomez RM** (1995). Researches on the suitability of modified atmosphere packaging for shelf-life and quality improvement of apricot fruit.- *Acta Hort* **384**: 633-638.

**Chang C, Kwok SF, Bleeker AB et Meyerowitz EH** (1993). *Arabidopsis* ethylene response gene *ETR1*. Similarity of product to two component regulators.- *Science.* **262**: 539-544.

**Chappell J, Hahlbrock K et Boller T** (1984). Rapid induction of ethylene biosynthesis in cultured parsley cell by fungal elicitor and its relationship to the induction of phenylalanine ammonialyase.- *Planta* **161** : 475-480.

**Chao Q, Rothenberg M, Solano R, Roman G, Terzagi W et Ecker JR** (1997). Activation of the ethylene gas response pathway in arabidopsis by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins.- *Cell* **89**: 1133-1144.

**Chevallier T, De Rigal D, Mbégué-A-Mbégué D, Gaillard F, Forget-Richard F et Fils-Lycaon B** (1999). Molecular cloning and expression of a cDNA polyphenol oxidase isolated from apricot fruit (*Prunus armeniaca* cv. Bergeron).- *Plant Physiol.* **119**: 1261-1269.

**Chick W et Leung PC** (1997). Immunopurification and characterization of a 40 kDa 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid N-malonyltransferase from mung bean seedling hypocotyls.- *Plant Physiol* **113** : 119-126.

**Choi D, Kim HM, Yun HK, Park JA, Kim WT et Bok SH** (1996). Molecular cloning of metallothionein-like gene from *Nicotiana glutinosa* L. and its induction by wounding and tobacco mosaic virus infection.- *Plant Physiol.* **112**: 353-359.

**Christoffersen RE, Warm E et Laties GG** (1982). Gene expression during fruit ripening in avocado.- *Planta* **155**: 52-57.

**Civello PM, Powell ALT, Sabehat A et Bennett AB** (1999). An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit.- *Plant Physiol.* **121**: 1273-1279.

**Clark KL, Larsen PB, Wang X et Chang C** (1998). Association of the *Arabidopsis* CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors.- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 5401-5406.

**Clendennen SK et May GD** (1997). Differential gene expression in ripening banana fruit.- *Plant Physiol.* **115**: 463-469.

**Cochran BH, Zumstein P, Zullo J, Rollins B, Mercola M et Stiles CD** (1987). Differential colony hybridization: molecular cloning from a zero data base. In **Barnes D et Sirbasku DA** eds.- *Methods in Enzymology* **147** : 64-85. Academic Press, New York.

**Cordes S, Deikman J, Margossian LJ et Fischer RL** (1989). Interaction of a developmentally regulated DNA-binding factor with sites flanking two different fruit-ripening gene from tomato.- *Plant Cell* **1**: 1025-1034.

**Corpet F** (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering.- *Nucl. Acids Res* **16**: 10881-10890.

**Coupe SA, Taylor JE et Roberts JA (1995).** Characterization of mRNA encoding a metallothionein-like protein that accumulates during ethylene-promoted abscission of *Sambucus nigra* leaflets.- *Planta* **197**: 442-447.

**Coupe SA, Taylor JE et Roberts JA (1997).** Temporal and spatial expression of mRNAs encoding pathogenesis-related proteins during ethylene-promoted leaflet abscission in *Sambucus nigra* leaflets.- *Plant Cell Environ.* **20**: 1517-1524.

**Cutillas-Iturralde A, Fulton DC, Fry SC et Lorences EP (1998).** Xyloglucan-derived oligosaccharides induce ethylene synthesis in persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruit.- *J. Exp. Bot.* **49**: 701-706.

**Davies KM, Hobson GE, et Grierson D (1988).** Silver ions inhibits the ethylene-stimulated production of ripening related mRNAs in tomato.- *Plant Cell Environ.* **11**: 729-738.

**Davies KM et Grierson D (1989).** Identification of cDNA clones for tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) mRNAs that accumulate during ripening and leaf senescence in response to ethylene.- *Planta.* **79** : 73-80.

**Davies CJ et Henrissat B (1995).** Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases.- *Structure* **3** : 853-859.

**Dean JFD et Mattoo AK (1991).** The role of ethylene in fruit ripening and senescence. In : **Fox PF** (eds) *Food and Enzymology* Vol I, 271-301. Elseivers Science publishers LTD. Essex. England. ISSN 1-85166-615-X.

**Deikman J (1997).** Molecular mechanisms of ethylene regulation gene transcription.- *Physiol. Plant.* **100**: 561-566.

**Deikman J et Fischer RL (1988).** Interaction of a DNA binding factor with the 5'-flanking region of an ethylene-responsive fruit ripening gene from tomato.- *EMBO J.* **7**: 3315-3320.

**Del Cura B, Escribano MI, Zamorano JP et Morodio C (1996).** High carbon dioxide delayed postharvested changes in RuBPCase and polygalacturonase-related protein in cherimoya peel.- *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **121**: 735-739.

**Devereux J, Haerberli P et Smithies O (1984).** A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX.- *Nucleic Acids Res* **12**: 387-395.

**De Veau EJI, Gross KC, Huber DJ et Watada AE (1993).** Degradation and solubilisation of pectin by  $\beta$ -Galactosidases purified from avocado mesocarp.- *Physiol. Plant.* **87** : 279-285.

- Dominguez-Puigjaner E, Vendrell M, Ludevig MD** (1992). Differential protein accumulation in banana fruit during ripening.- *Plant Physiol.* **98**: 157-162.
- Dopico B, Lowe AL, Wilson ID, Merodio C et Grierson D** (1993). Cloning and characterization of avocado fruit mRNAs and their expression during ripening and low-temperature storage.- *Plant Mol. Biol.* **21**: 437-449.
- Dupille E, Rombaldi C, Lelièvre JM, Cleyet-Marel JC, Pech JC et Latché A** (1993). Purification, properties and partial amino-acid sequence of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Oxydase from apple fruits.- *Planta* **190** : 65-70.
- Dupille E et Zacharias L** (1996). Extraction and biochemical characterization of wond-induced ACC oxydase from citrus peel.- *Plant Sci.* **114** : 53-60.
- Ecker JR** (1995). The ethylene signal transduction pathway in plants.- *Science* **268**: 667-675.
- Edelman L et Kende H** (1990). A comparaison of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid synthase *in vitro* translation product and *in vivo*-labeled protein in ripening tomatoes.- *Planta* **182** : 635-638.
- Erdmann H, Griesbach RJ, Lawson RH et Mattoo AK** (1989). 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic acid-dependent ethylene production during re-formation of vacuoles in evacuated protoplast of *petunia hybrida*.- *Planta* **179**: 196-202.
- Felix G et Meins FJr** (1987). Ethylene regulation of  $\beta$ -1,3-glucanase in tobacco. - *Planta* **172**: 386-392.
- Felix G, Grosskopf DF, Regenass M, Basse CW et Boller T** (1991). Elicitor-induced ethylene biosynthesis in tomato cells. Characterization and use as a bioassay for elicitor action.- *Plant Physiol.* **97**: 19-25.
- Feinberg AP et Vogelstein B** (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specificity activity.- *Anal. Biochem.* **132**: 6.
- Fils-Lycaon B et Buret M** (1991). Changes in glycosidase activity during development and ripening of melon.- *Postharvest Biol. Technol.* **1**: 143-151.
- Fils-Lycaon BR, Wiersma PA, Eastwell KC, Sautiere P** (1996). A cherry protein and its gene, abundantly expressed in ripening fruit, have been identified as thaumatin-like.- *Plant Physiol.* **111**: 269-273.
- Fisher R et Bennett A** (1991). Role of cell wall hydrolases in fruit ripening.- *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**: 675-703.
- Flüher R et Mattoo AK** (1996). Ethylene- Biosynthesis and perception.- *Crit. Rev. Plant Sci.* **15**: 479-523.

**Frohman MA, Dush MK et Martin GR** (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts : Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer.- *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85** : 8998-9002.

**Gane R** (1934). Production of ethylene by some ripening fruit.- *Nature* **134**: 1008.

**Gavel Y et von Heijne G** (1990). A conserved cleavage-site motif in chloroplast transit peptides.- *FEBS Lett.* **261**: 455-458.

**Gerasopoulos D et Richardson DG** (1996). Effects of exogenous propylene and fruit calcium on ripening of non-chilled and chilled Anjou pears.- *Postharv. Biol. Technol.* **8**: 111-120.

**Giovane A, Quagliuolo L, Castaldo D, Servillo L et Balestrieri C** (1990). Pectin-methylesterase from *Actinidia chinensis* fruits.- *Phytochemistry* **29**: 2821-2823.

**Giovannoni JJ, DellaPenna D, Fischer RL et Bennett AB** (1989). Expression of a chimeric polygalacturonase gene in transgenic *rin* (ripening inhibitor) tomato fruit results in polyuronide degradation but not fruit softening.- *Plant cell* **1**: 53-63.

**Glover H et Brady CJ** (1994). Purification of three pectin esterases from peaches.- *Phytochemistry* **37**: 949-955.

**Golding JB, Shearer D, Wyllie SG et McGlassonWB** (1998). Application of 1-MCP and propylene to identify ethylene-dependant ripening processes in mature banana fruit.- *Postharvest Biol. Technol.* **14**: 87-98.

**Gonzalez-Bosch C, Brummell DA et Bennett AB** (1996). Differential expression of two endo-1,4-b-Glucanase genes in pericarp and locules of wild-type and mutant tomato fruit.- *Plant Physiol.* **111**: 1313-1319.

**Gorny JR et Kader AA** (1996). Controlled-atmosphere suppression of ACC synthase and ACC oxydase in “golden Delicious” apples during long-term cold storage.- *J Amer. Soc. Hort. Sci.* **121**: 751-755.

**Gorny JR et Kader AA** (1997). Low oxygene and elevated carbon dioxide atmospheres inhibit ethylene biosynthesis in preclimacteric and climacteric apple fruit.- *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **122**: 542-546.

**Gray J, Picton S, Shabbeer J, Schuch W et Grierson D** (1992). Molecular biology of fruit ripening and its manipulation with antisense genes.- *Plant Mol. Biol.* **19**: 69-87.

**Gross KC** (1985). Promotion of ethylene evolution and ripening of tomato fruit by galactose.- *Plant Physiol.* **79**: 306-607.

**Grosset J, Marty I, Chartie Y et Meyer Y** (1990). mRNAs newly synthesized by tobacco protoplasts are wound-inducible.- *Plant Mol. Biol.* **15**: 485-496.

**Guichard D** et **Fournier N** (1990). Dosage des composés volatils présents dans différentes variétés d'Abricot et corrélation avec la typicité d'arôme. In : 9<sup>ème</sup> colloque sur les recherches fruitières INRA-ctifl "la maîtresse de la qualité des fruits frais". Avignon -4-5-5 décembre 1990. pp 229-237.

**Guis M**, **Botondi R**, **Ben-Amor M**, **Ayub R**, **Bouzayen M**, **Pech JC** et **Latché A** (1997). Ripening-associated biochemical traits of cantaloupe charentais melons expressing an antisense ACC oxidase transgene.- *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **122**: 748-751.

**Guo L**, **Arteca RN**, **Phillips AT** et **Liu Y** (1992). Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate N malonyl-transferase from etiolated mung bean hypocotyls.- *Plant Physiol.* **100** : 2041-2045.

**Guy M** et **Kende H** (1984). Conversion of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic acid to ethylene by isolated vacuoles of *Pisum sativum* L.- *Planta* **160** : 281-287.

**Hall LN**, **Tucker GA**, **Smith CJS**, **Watson CF**, **Seymour GB**, **Bundick Y**, **Boniwell JM**, **Fletcher JD**, **Ray JA**, **Schuch W**, **Bird CR** et **Grierson D** (1993). Antisense inhibition of pectin esterase gene expression in transgenic tomatoes. - *Plant J* **3**: 121-129.

**Hall LN**, **Bird CR**, **Picton S**, **Tucker GA**, **Seymour GB** et **Grierson D** (1994). Molecular characterization of cDNA clones representing pectin esterase isoenzymes from tomato.- *Plant Mol. Biol.* **25**: 313-328.

**Hall AE**, **Chen QG**, **Findell JL**, **Schaller GE** et **Bleecker AB** (1999). The relationship between ethylene binding and dominant insensitivity conferred by mutant forms of the *ETR1* ethylene Receptor.- *Plant Physiol.* **121**: 291-299.

**Hamilton NE**, **Lycett GW** et **Grierson D** (1990). Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants.- *Nature.* **346** : 284-287.

**Hamilton NE**, **Bouzayen M** et **Grierson D** (1991). Identification of a tomato gene for the ethylene-forming enzyme by expression in yeast.- *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **88** : 7434-7437.

**Harpham NVJ**, **Berry AW**, **Holland MG**, **Hemsley RJ**, **Novikova GV**, **Smith AR** et **Hall MA** (1996). Ethylene binding sites in higher plants.- *Plant Grow. Reg.* **18**: 71-77.

**Harrimann RW**, **Tieman DM** et **Handa AK** (1991). Molecular cloning of tomato pectin-methylesterase gene and its expression in Rutgers, Ripening inhibitor, noripening and never ripening tomato fruit. - *Plant Physiol.* **97**: 80-87.

**Henrissat B**, **Callebaut I**, **Fabrega S**, **Lehn P**, **Mornon JP** et **Davies G** (1995). Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases.- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 7090-7094.

**Holland MG, Berry AW, Cowan DSC, Harpham NVJ, Hemsley RJ, Moshkov IE, Novikova GV, Smith AR et Hall MA** (1996). Ethylene perception and signal transduction in higher plants.- *Russian J. Plant Physiol.* **43**: 17-25.

**Hofmann K, Bucher P, Falquet L et Bairoch A** (1999). The PROSITE database. Its status in 1999.- *Nucleic Acid Res* **27**: 215-219.

**Hua J, Sakai H, Nourizadeh S, Chen QG, Bleecker AB, Ecker JR et Meyerowitz EM** (1998). *EIN4* and *ERS2* are members of the putative ethylene receptor gene family in Arabidopsis.- *Plant Cell* **10**: 1321-1332.

**Huber DJ** (1983). Polyuronide degradation and hemicellulose modifications in ripening tomato fruit. - *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **108**: 405-409.

**Ievinsh G et Tillberg E** (1995). Stress-induced ethylene biosynthesis in pine needles: A search for the putative 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid-independant pathway.- *J. Plant Physiol.* **145**: 308-314.

**Itzhaki H, Maxon JH et Woodson WR** (1994). An ethylene-responsive enhancer element is involved in the senescence-related expression of the carnation glutathion-S-transferase (*GST1*) gene.- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 8925-8929.

**Jin ES, Lee JH, Park JA et Kim TW** (1999). Temporal and spatial regulation of the expresion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase by ethylene in mung bean (*Vigna radiata*).- *Physiol. Plant.* **105**: 132-140.

**Johnson PR et Ecker JR** (1998). The ethylene gas signal transduction pathway: A molecular perspective.- *Annu. Rev. Genet.* **32**: 227-254.

**Kader AA** (1986). Biochemical and physiological basis for effects of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables.- *Food Technol.* **40**: 99-104.

**Karvouni Z, John I, Taylor JE, Watson CF, Turner AJ et Grierson D** (1995). Isolation and characterization of a melon cDNA clone encoding phytoene synthase.- *Plant Mol. Biol.* **27**: 1153-1162.

**Keller E et Cosgrove DJ** (1995). Expansin in growing tomato leaves.- *Plant J.* **8**: 795-802.

**Kende H** (1993). Ethylene biosynthesis.- *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44** : 283-307.

**Ketsa S et Daengkanit T** (1999). Firmness and activities of polygalacturonase, pectinesterase,  $\beta$ -galactosidase and cellulase in ripening durian harvest at different stages of maturity.- *Scientia Horticultuarae* **80**: 181-188.



**Ketsa S, Chidtragool S, Klein JD et Lurie S** (1999b). Ethylene synthesis in mango fruit following heat treatment.- *Postharvest Biol. Technol.* **15** : 65-72.

**Ketsa S, Phakawatmongkol W et Subhadrabhandhu S** (1999b). Peel enzymatic activity and color changes in ripening mango fruit.- *J. Plant Physiol.* **154**: 363-366.

**Kim JH, Kim WT, Kang BG et Yang SF** (1997). Induction of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid Oxydase mRNA by ethylene in mung bean hypocotyls : involvement of both protein phosphorylation and dephosphorylation in ethylene signalling.- *Plant J.* **11** : 399-405.

**Kitagawa Y, Kanayama Y et Yamaki S** (1995). Isolation of  $\beta$ -galactosidase fractions from japanese pear: Activity against native cell wall polysaccharides.- *Physiol. Plant.* **93**: 545-550.

**Klee HJ, Hayford MB, Kretzmer KA, Barry GF et Kishore GM** (1991). Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants.- *Plant Cell* **3** : 1187-1193.

**Klee HJ** (1993). Ripening physiology of fruit from transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants with reduced ethylene synthesis.-*Plant Physiol.* **102**: 911-916.

**Kneissl ML et Deikman J** (1996). The tomato E8 gene influences ethylene biosynthesis in fruit but not in flowers.- *Plant Physiol.* **112** : 537-547.

**Knight LI, Rose RC et Crocker W** (1910). Effect of various gases and vapors upon etiolated seedlings of the sweet pea.- *Science* **31**: 635-636.

**Kwak S-H et Lee SH** (1997). The requirements for  $Ca^{2+}$ , protein phosphorylation, and dephosphorylation for ethylene signal transduction in *Pisum Sativum* L.- *Plant Cell Physiol.* **38** : 1142-1149.

**Laemmli UK** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.- *Nature* **227**: 680-685.

**Lashbrook CC, Tieman DM et Klee HJ** (1998a). Differential regulation of the tomato ETR gene family throughout plant development.- *Plant J.* **15**: 243-252.

**Lashbrook CC, Giovannoni JJ, Hall BD, Fischer RL et Bennett AB** (1998b). Transgenic analysis of tomato endo- $\beta$ -1,4-glucanase gene function. Role of *cell* in floral abscission. - *Plant J.* **13**: 303-310.

**Lasserre E, Bouquin T, Hernandez JA, Bull J, Pech JC et Balagué C** (1996). Structure and expression of three genes encoding ACC oxidase homologs from melon (*Cucumis melo* L.).- *Mol Gen. Genet.* **251** : 81-90.

**Latché A, Ayub R, Martinez G, Guis M, Ben Amor M, Rombaldi C, Pech JC et Bouzayen M** (1995). Biosynthèse et mode d'action de l'hormone végétale éthylène.- *Fruits* **50**: 379-396.

**Lay VJ., Prescott AG, Thomas PG et John P** (1996). Heterologous expression and site-directed mutagenesis of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from kiwi fruit.- *Eur. J. Biochem.* **242**: 228-234.

**Ledger SE et Gardner RC** (1994). Cloning and characterization of five cDNAs for genes differentially expressed during fruit development of kiwi fruit (*Actinidia deliciosa* var. *Deliciosa*).- *Plant Mol. Biol.* **25**: 877-886.

**Lelièvre JM, Tichit L, Fillion L, Larrigaudière C, Vendrell M et Pech JC** (1995). Cold-induced accumulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase protein in Granny Smith apples.- *Postharv. Biol. Technol.* **5**: 11-17.

**Lelièvre JM, Latché A, Jones B, Bouzayen M et Pech JC** (1997). Ethylene and fruit ripening.- *Physiol. Plant.* **101**: 727-739.

**Li ZC, Durachko DM et Cosgrove DJ** (1993). An oat coleoptile wall protein that induces wall extension in vitro and that is antigenically related to a similar protein from cucumber hypocotyls.- *Planta* **191**: 349-356.

**Li N et Mattoo AK** (1994). Deletion of the carboxyl-terminal region of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, a key protein in the biosynthesis of ethylene, results in catalytically hyperactive, monomeric enzyme.- *J. Biol. Chem.* **269** : 6908-6917.

**Li N, Huxtable S, Yang SF et Kung SD** (1996). Effects of N-terminal deletions on 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase activity.- *FEBS letters* **378** : 286-290.

**Liang P et Pardee AB** (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction.- *Science* **257**: 967-971.

**Lincoln JE, Cordes S, Read E et Fischer RL** (1987). Regulation of gene expression by ethylene biosynthesis in fruit but not in flowers.- *Plant Physiol.* **112**: 537-547.

**Liu Y, Su LY et Yang SF** (1985a). Ethylene promotes the capability to methylate 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and D-amino acids in preclimacteric tomato fruit.- *Plant Physiol* **77** : 891-895.

**Liu Y, Hoffman NE et Yang SF** (1985b). Promotion by ethylene of the capability to convert 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in preclimacteric tomato and cantaloupe fruit.- *Plant Physiol* **77** : 407-411.

**Liu J, Hara C, Umeda M, Zhao Y, Okita TW et Uchimiya H** (1995). Analysis of randomly isolated cDNAs from developing endosperm of rice (*Oryza sativa* L.): evaluation of expressed sequence tags, and expression levels of mRNAs.- *Plant Mol. Biol.* **29**: 685-689

**Lurie S, Handros A, Fallik E et Shapira R** (1996). Reversible inhibition of tomato fruit gene expression at high temperature : Effects on tomato fruit ripening.- *Plant Physiol.* **110** : 1207-1214.

**Mansour R, Latché A, Vaillant V, Pech JC et Reid MS** (1986). Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate in ripening apple fruit.- *Physiol. Plant.* **66** : 495-502.

**Marin E, Nussaume L, Queseda A, Gonneau M, Sotta B, Hugueney P, Frey A, Maron-Poll A** (1996). Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbatifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the *ABA* locus of *Arabidopsis thaliana*.- *EMBO J* **15**: 2331-2342.

**Martin MN et Saftner RA** (1995). Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate N malonyl-transferase from tomato fruit.- *Plant Physiol.* **108** : 1241-1249.

**Martin MN, Cohen JD et Saftner RA** (1995). A new of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic Acid-conjugating activity in tomato fruit.- *Plant Physiol.* **109** : 917-926.

**Markovic O et Jornvall H** (1992). Disulfide bridges in tomato pectinesterase: variations from pectinesterase of other species; conservation of possible active site segments.- *Protein Sci.* **1**: 1288-1292.

**Mason MG et Botella JR** (1997). Identification and characterisation of two 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase cDNAs expressed during papaya (*Carica papaya*) fruit ripening.- *Aust. J. Plant Physiol.* **24**: 239-244.

**Maunder MJ, Holdsworth MJ, Slater A, Knapp JE, Bird CR, Schuch W et Grierson D** (1987). Ethylene stimulates the accumulation of ripening-related mRNAs in tomatoes.- *Plant Cell Environ.* **10**: 177-184.

**Maxon JH et Woodson WR** (1996). Cloning of a DNA-Binding protein that interacts with the ethylene-responsive enhancer element of the carnation *GST1* gene. -*Plant. Mol. Biol.* **31**: 751-759.

**Mbéguié-A-Mbéguié D** (1996). Identification et expression de gènes impliqués dans la perte de fermeté de l'abricot (*Prunus armeniaca*): Relation avec l'émission d'éthylène. Diplôme d'Etude Approfondie de Nutrition : Aspects Moléculaires et Cellulaires., Université d'AIX-Marseille III, 30 p.

**Mbéguié-A-Mbéguié D, Gomez RM et Fils-Lycaon BR** (1997). Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of a Metallothionein-like Protein From Apricot Fruit (Accession No. U97494). Gene Expression During Fruit Ripening. (PGR97-160).- *Plant Physiol.* **115**: 1288.

**Mbéguié-A-Mbéguié D, Chahine H, Gomez RM, Gouble B, Audergon JM, Souty M, Albagnac G et Fils-Lycaon B** (1999). Molecular cloning and expression of a cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase from apricot fruit (*Prunus armeniaca* cv. Bergeron).- *Physiol. Plant.* **105** : 294-303.

**Mbéguié-A-Mbéguié D, Gomez RM, Gouble B, Fils-Lycaon B** (1999). Two cDNA clones encoding Expansin protein from apricot fruit (*Prunus armeniaca*) are differently regulated during ripening and Postharvested treatments. Soumise à Plant Physiology

**McGarvey DJ et Christoffersen RE** (1992). Characterization and kinetic parameters of ethylene-forming enzyme from avocado fruit.- *J. Biol. Chem.* **267**: 5964-5967.

**McMurchie EJ, McGlasson WB et Eaks IL** (1972). Treatment of fruit with propylene gives information about the biogenesis of ethylene.- *Nature* **237** : 235-236.

**McQueen-Mason S, Durachko DM et Cosgrove DJ** (1992). Two endogenous proteins that induced cell wall extension in plants.- *Plant cell* **4**: 1425-1433.

**McQueen-Mason S et Cosgrove DJ** (1994). Disruption of hydrogen bonding between plant cell polymers by proteins that induce wall extension.- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 6574-6578.

**Medina-Suarez R, Manning K, Fletcher J, Aked J, Bird CR et Seymour G** (1997). Gene expression in the pulp of ripening bananas. Two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide Gel electrophoresis of in vitro translation products and cDNA cloning of 25 different ripening-related mRNAs.- *Plant Physiol.* **115** : 453-461.

**Mehta AM, Jordan RL, Anderson JD et Mattoo AK** (1988). Identification of a unique isoform of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid synthase by monoclonal antibody- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** : 8810-14.

**Meinkoth J et Wahn G** (1984). Hybridization of nucleic acid immobilized in solid support.- *Anal. Biochem.* **138**: 267-285.

**Mendoza EMT, Laurena AG et Uritani I** (1994). Astringency and polyphenols in banana. In : **Uritani I, Garcia VV, Mendoza EMT** (eds) *Postharvest biochemistry of plant food-materials in the tropics*. Japan Scientific Societies press, Tokyo, pp 177-191.

**Mitchell T, Porter AJR et John P** (1988). Authentic activity of the Ethylene-Forming-Enzyme observed in membranes obtained from kiwifruit (*Actinidia deliciosa*).- *New Phytol.* **109** : 313-319.

**Moriguchi T, Kita M, Hisada S, Endo-Inagaki T et Omura M** (1998). Characterization of gene repertoires at mature stage of citrus fruits through random sequencing and analysis of redundant Metallothionein-like genes expressed during fruit development.- *Gene* **211**: 221-227.

**Moser D et Matile P** (1997). Chlorophyll breakdown in ripening fruits of *Capsicum annuum*.- *J. Plant Physiol.* **150**: 759-761.

**Mugugaiyan S** (1993). Changes in protein content in peel and pulp of two banana varieties.- *Geobios* **20**: 18-21.

**Murray AJ, Hobson GE, Schuch W et Bird CR** (1993). Reduced ethylene synthesis in EFE antisense tomatoes has differential effects on fruit ripening processes.- *Postharvest Biol. Technol.* **2**: 301-313.

**Nakagawa J, Nakajima N et Imaseki H** (1988). Immunochemical difference of wound-induced 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid synthase of mesocarpe of *Cucurbita maxima* Duchs fruits.- *Plant Cell. Physiol.* **27** : 1021-1029.

**Nakajima N et Imaseki H** (1986). Purification and properties of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid synthase of mesocarp of *Cucurbita maxima* Duch. fruits.- *Plant Cell Physiol.* **27**: 969-980.

**Nakajima N, Nakagawa J et Imaseki H** (1988). Molecular size of wound-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from *Cucurbita maxima* Duch. And change of translatable mRNA of the enzyme after wounding.- *Plant Cell Physiol.* **29**: 989-998.

**Nakajima N, Mori H, Yamazaki K et Imaseki H** (1990). Molecular cloning and sequence of a complementary DNA encoding 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid synthase induced by tissue wounding.- *Plant Cell Physiol.* **29** : 989-98.

**Nakatsuka A, Shiomi S, Kubo Y, Inaba A** (1997). Expression and internal feedback regulation of ACC synthase and ACC oxidase genes in ripening tomato fruit.- *Plant Cell Physiol.* **38**: 1103-1110.

**Nakatsuka A, Murachi S, Okunishi H, Shiomi S, Nakano R, Kubo Y et Inaba A** (1998). Differential expression and internal feedback regulation of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid synthase, 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during fruit development and ripening.- *Plant Physiol.* **118**: 1295-1305.

- Nicolas J, Richard-Forget FC, Goupy PM, Amiot MJ et Aubert SY** (1994) Enzymatic browning reactions in apple and apple products.- *Crit Rev Food Sci Nutr* **34**: 109-157.
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S et von Heijne G** (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites.- *Protein Engineering* **10** : 1-6.
- Oeller PW, Min-Wong L, Taylor LP, Pike DA et Theologis A** (1991). Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA.- *Science* **254**: 437-439.
- Oetiker JH et Yang SF** (1995). The role of ethylene in fruit ripening.- *Acta Hort.* **398**: 167-178.
- Ohme-Takagi M et Shinshi H** (1995). Ethylene-inducible DNA Binding Proteins that interact with an Ethylene-Responsive-Element. - *Plant Cell* **7**: 173-182.
- Peck SC et Kende H** (1995). Sequential induction of the ethylene biosynthetic enzymes by indoles-3-acetic acid in etiolated peas.- *Plant Mol. Biol.* **28**: 293-301.
- Peck SC et Kende H** (1998). Differential regulation of genes encoding ACC synthase in etiolated pea seedlings: effects of indole-3-acetic acid , wounding and ethylene.- *Plant Mol. Biol.* **38**: 977-982.
- Peiser G et Yang SF** (1998). Evidence for 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid being the major conjugate of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid in tomato fruit.- *Plant Physiol.* **116**: 1527-1532.
- Penarrubia L, Aguillar M, Margossian L et Fischer RL** (1992). An antisens gene stimulates ethylene hormone production during tomato fruit ripening.- *Plant Cell* **4** : 681-687.
- Plastow GS** (1988). Molecular cloning and nucleotide sequence of the pectinemethylesterase gene of *Erwinia chrysanthemi* B374.- *Mol. Microbiol.* **2** : 247-254.
- Poneleit LS et Dilley DR** (1993). Carbon dioxide activation of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) Oxydase in ethylene biosynthesis.- *Postharvest Biol. Technol.* **3** : 191-199.
- Porter AJR, Borlakoglu JT et John P** (1986). Activity of Ethylene-Forming-Enzyme in relation to plant cell structure and organization.- *J. Plant. Physiol.* **125** : 207-216.
- Prescott AG et John P** (1996). DIOXYGENASE : Molecular Structure and Role in Plant Metabolism.- *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47** : 245-271.
- Pressey R** (1983).  $\beta$ -Galactosidase in ripening tomatoes.- *Plant Physiol.* **71**: 132-135.
- Pressey R et Avants JK** (1972). Multiples forms of pectinesterase in tomatoes.- *Phytochemistry* **11** : 3139-3142.

**Privalle LS et Graham JS (1987).** Radio-labeling of wound-inducible pyridoxal phosphate-utilizing enzyme : evidence for its identification as ACC synthase.- *Arch. Biochem. Biophys.* **253** : 333-340.

**Ramassamy S, Olmos E, Bouzayen M, Pech JC et Latché A (1998).** 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase of apple fruit is periplasmic.- *J. Exp. Bot.* **49**: 1909-1915.

**Ranwala AP, Snematsu C et Masuda H (1992).** The rôle of  $\beta$ -Galactosidases in the modification of cell wall components during muskmelon fruit ripening.- *Plant Physiol.* **100**: 1318-1325.

**Ray J, Knapp J, grierson D, Bird C, Schuch W (1988).** Identification and sequence determination of a cDNA clone for tomato pectine esterase.- *Eur. J. Biochem.* **174** : 119-124.

**Reid MS (1980).** Ethylene and abscission.- *Hort. Sci.* **20**: 45-48.

**Rodriguez FI, Esch JJ, Hall AE, Binder BM, Schaller GE et Bleecker AB (1999).** A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from Arabidopsis.- *Science* **283**: 996-998.

**Rombaldi C, Lelièvre JM, Latché A, Petitprez M, Bouzayen M et Pech JC (1994).** Immunocytolocalization of ACC Oxydase from tomato and apple fruits.- *Planta.* **192** : 453-460.

**Rose JKC, Lee HH et Bennett AB (1997).** Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated.- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 5955-5960.

**Rose JKC, Hadfield KA, Labavitch JM et Bennett AB (1998).** Temporal sequence of cell wall disassembly in rapidly ripening melon fruit.- *Plant Physiol.* **117** : 345-361.

**Ross GS, Redgwell RJ et MacRae EA (1993).** Kiwifruit  $\beta$ -galactosidase. Isolation and activity against specific cell wall polysaccharides.- *Planta* **189** : 499-506.

**Ross GS, Wegrzyn T, MacRae EA, Redgwell RJ (1994).** Apple beta-galactosidase activity against cell wall polysaccharides and characterization of a related cDNA clone.- *Plant Physiol.* **106** : 521-528.

**Rothan C, Duret S, Chevalier C, Raymond P (1997)** Suppression of ripening-associated gene expression in tomato fruit subjected to a high CO<sub>2</sub> concentration. *Plant Physiol* **114**: 225-263

**Rottmann WH, Peter GF, Oeller PW, Keller JA, Shen NF, Nagy BP, Taylor LP, Campbell AD et Theologis A (1991).** 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid synthase in tomato is encoded by a multigene family whose transcription is induced during fruit and floral senescence.- *J. Mol. Biol.* **222** : 937-961.

**Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich H. et Arnheim N** (1985). Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.- *Science* **230**: 1350-1354.

**Sakurai N et Nevins DJ** (1997). Relationship between fruit softening and wall polysaccharides in avocado (*Persea americana* Mill) mesocarp tissues.- *Plant cell Physiol.* **38**: 603-610.

**Sambrook J, Fritsch EF et Maniatis T** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Sanz C, Olias JM et Perez AG** (1997). Aroma biochemistry of fruits and vegetables. In : *Proceeding of the phytochemical society of Europe. Phytochemistry of fruit and vegetable.* Tomas-Barberan FA et Robins RJ. Clarendon Press. Oxford.

**Sato T, Oeller PW et Theologis A** (1991). The 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid synthase of Cucurbita: Purification, properties, expression in *Escherichia Coli* and primary structure determination by DNA sequence analysis.- *J. Biol. Chem* **26**: 3752-3759.

**Sato S et Yang SF** (1989). Inactivation of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid synthase by L-vinylglycine as related to the mechanism-based inactivation of the enzyme by S-Adenosyl-L-Methionine - *Plant. Physiol.* **91**: 1036-1039.

**Sato S, Mori H and Imaseki H** (1993). Monomeric and dimeric forms and the mechanism-based inactivation of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid synthase.- *Plant Cell Physiol.* **34**: 753-760.

**Schaller GE et Blecker AB** (1995). Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the Arabidopsis ETR1 gene.- *Science* **270**: 1809-1811.

**Shaw JF, Chou YS, Chang RC et Yang SF** (1996). Characterization of the ferrous ion binding sites of apple 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase by site-directed mutagenesis.- *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **225**: 697-100.

**Shcherban TY, Shi J, Durachko DM, Guiltinan MJ, McQueen-Mason S, Shieh M et Cosgrove DJ** (1995). Molecular cloning and sequence analysis of expansins, a highly conserved multigene family of proteins that mediate cell wall extension in plants.- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 9245-9249.

**Sheehy RE, Kramer MK et Hiatt WR** (1988). Reduction of polygalacturonase activity in tomato fruit by antisense RNA.- *Proc Natl Acad USA* **85**: 8805-8809.

**Shiomi S, Yamamoto M, Nakamura R et Inaba A** (1999). Expression of ACC synthase and ACC oxydase genes in melons harvested at different stages of maturity.- *J. Japan Soc. Hort. Sci.* **68**: 10-17.



**Smith DL, Starrett DA et Gross KC** (1998). A gene coding for tomato fruit beta-galactosidase II is expressed during fruit ripening. Cloning, characterization, and expression pattern.- *Plant Physiol.* **117** : 417-423.

**Simpson SD, Ashford DA, Harvey DJ et Bowles DJ** (1998). Short chain oligogalacturonides induce ethylene production and expression of the gene encoding aminocyclopropane 1-carboxylic acid oxidase in tomato plants.- *Glycobiology* **8**: 579-583.

**Sisler EC et Pian A** (1973). Effect of ethylene and cyclic olefins on tobacco leaves.- *Tob. Sci.* **17**: 68-72.

**Sisler EC** (1979). Measurement of ethylene binding in plant tissue.- *Plant Physiol.* **64**: 538-542.

**Sisler EC et Wood C** (1988). Interaction of ethylene and CO<sub>2</sub>.- *Physiol. Plant.* **73** : 440-444.

**Sisler EC et Serek M** (1999). Compounds controlling the ethylene receptor.- *Bot Bull. Acad. Sin.* **40**: 1-7.

**Sitrit Y et Bennett AB** (1998). Regulation of tomato fruit polygalacturonase mRNA accumulation by ethylene : A Re-Examination.- *Plant Physiol.* **116** : 1145-1150.

**Sive HL et St John T** (1988). A simple subtractive hybridization technique employing photoactivatable biotin and phenol extraction.- *Nucleic Acids Res.* **16**: 10937.

**Southern EM** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.- *J. Mol. Biol.* **98** : 503-517.

**Spanu P, Reinhart D et Boller T** (1991). Analysis and cloning of ethylene-forming enzyme from tomato by fonctionnal expression of its mRNAs in *Xenopus laevis* oocyte.- *EMBO J.* **10** : 2007-2013.

**Spanu P, Grosskopf DG, Felix G et Boller T** (1994). The apparent turnover of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Synthase in tomato cells is regulated by protein phosphorylation and dephosphorylation.- *Plant Physiol.* **106** : 529-535.

**Speirs J, Brady CJ, Grierson D, Lee E** (1984). Changes in ribosome organization and messenger RNA abundance in ripening tomato fruits.- *Aust. J. Plant Physiol.* **11**: 225-223.

**Summers JE, Voeselek LACJ, Blom CWPM, Lewis MJ et Jackson MB** (1996). *Potamogeton pectinatus* is constitutively incapable of synthesizing ethylene and lacks 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid Oxidase.- *Plant Physiol.* **111**: 901-908.

**Tabor CW et Tabor H** (1984). Methionine adenosyl transferase (S-adenosylmethionine synthase) and S-adenosylmethionine decarboxylase.- *Adv. Enzymol.* **56** : 251-282.

- Takatsugu H, Seah, BC et Shigeki M** (1998). SOSUI: Classification and Secondary Structure Prediction System for Membrane Proteins. - *Bioinformatics* **14**: 378-379.
- Tang X, Wang H, Brandt AS et Woodson WR** (1993). Organization and structure of the 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid Oxidase genes from *Petunia hybrida*.- *Plant Mol. Biol.* **23** : 1151-1164.
- Tarun AS et Theologis A** (1998). Complementation analysis of mutants of ACC synthase reveals the enzyme is a dimer with shared active sites.- *J. Biol. Chem.* **273**: 12509-12514.
- Tayed MA, Howe DL, Salleh HM, Sheflyan GA, Son JK et Woodard RW** (1999). Kinetic and mutagenic evidence for the role of histidine residues in the *Lycopersicon esculentum* 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase.- *J. Prot. Chem.* **18**: 55-68.
- Tieman DM, Harriman RW, Ramamohan G, Handa AK** (1992). An antisens pectin methylesterase gene alters pectin chemistry and soluble solids in tomato fruit.- *Plant Cell* **4**: 667-679
- Tieman DM et Klee H** (1999). Differential expression of two novel members of the tomato ethylene-receptor family.- *Plant Physiol.* **120**: 165-172.
- Trebitsh T, Goldschmidt EE et Riov J** (1993). Ethylene induced de novo synthesis of chlorophyllase, a chlorophyll degrading enzyme in citrus fruit peel.- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 9441-9445.
- Trentmann SM et Kende H** (1995). Analysis of *Arabidopsis* cDNA that shows homology to the tomato E8 cDNA.- *Plant Mol. Biol.* **29**: 161-166.
- Tuker GA et Brady CJ** (1987). Silver ions interrupt tomato fruit ripening.- *J. Plant Physiol.* **127**: 165-169.
- Van der Straeten D, Van Wiemeersch L, Goodman HM et Van Montagu M** (1989). Purification and partial characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from tomato pericarp.- *Eur. J. Biochem.* **182** : 639-647.
- Ververidis P et John P,** (1991). Completely recovery *in vitro* of Ehtylene-Forming-Enzyme activity.-*Phytochem.* **30**: 725-727.
- Vinson CR, Sigler PB et McKnight SL** (1989). Scissors-grip model for DNA recongnition by a family of leucine Zipper proteins.- *Science* **245** : 911-916.
- Vioque B et Castellano JM** (1994). Extraction and biochemical charcterization of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Oxydase from pear.- *Physiol. Plant.* **90** : 334-338.

**Vriezen WH, van Rijn CPE, Voesenek LACJ et Mariani C** (1997). A homolog of the *Arabidopsis thaliana* ERS gene is actively regulated in *Rumex palustris* upon flooding.-*Plant J.* **11**: 1265-1271.

**Vriezen WH, Hulzink R, Mariani C et Voesenek LACJ** (1999). 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Oxidase Activity Limits Ethylene Biosynthesis in *Rumex palustris* during Submergence.- *Plant Physiol.* **121**: 189-196.

**Wan CY et Wilkins TA** (1994). A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.).- *Anal. Biochem.* **223** : 7-12.

**Wang CY** (1990). Physiological and Biochemical effects of controlled atmospheres on fruits and vegetables. In: Food preservation by modified atmospheres. (Calderon M and Barkai-Golan R eds). CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 197-223.

**Wankier BN, Salunkhe DK et Campbell WF** (1970). Effects of controlled atmosphere storage on biochemical changes in Apricot and Peach fruit.- *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **95**: 604-609.

**White JA et Kende H** (1990). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid synthase : are there changes in size variants in tomato. *J. Plant Physiol.* **136** : 646-652.

**Whitelaw CA, Le Huquet JA, Thurman DA et Tomsett AB** (1997). The isolation and characterisation of a type II Metallothionein-like genes from tomato (*Lycopersicon esculentum* L.).- *Plant Mol Biol.* **33**: 503-511.

**Woodson WR, Park KY, Drory A, Larsen PB et Wang H** (1992). Expression of ethylene biosynthesis pathway transcripts in senescing carnation flowers.- *Plant Physiol.* **99** : 526-32.

**Xu R, Goldman S, Coupe S and Deikman J** (1996). Ethylene control of *E4* transcription during tomato fruit ripening involves two cooperative cis-elements. - *Plant. Mol. Biol.* **31**: 1117-1127.

**Xu ZC, Ikoma Y, Yano M, Ogawa K et Hyodo H** (1998). Varietal differences in the potential to produce ethylene and gene expression of ACC synthase and ACC oxidase between 'Kui mi' and 'Hong xin' of Chinese kiwifruit.- *J. Japan Soc. Hort. Sci.* **67**: 204-209.

**Yang SF et Hoffman NE** (1984). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants.- *Ann. Rev. Plant Physiol.* **35**: 155-189.

**Yang SF et Dong JG** (1993). Recent progress in research of ethylene biosynthesis.- *Bot. Bull. Acad. Sin.* **34**: 89-101.

**Yip WK, Dong JG, Kenny JW , Thompson GA et Yang SF** (1990). Characterization and sequencing of the active site of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid synthase.- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** : 7930-7934.

**Yoshii H et Imaseki H** (1982). Regulation of auxin induced ethylene biosynthesis. Repression of inductive formation of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid synthase, a key enzyme in ethylene biosynthesis.- *Arch. Biochem. Biophys.* **198**: 280-286.

**Zarembinski TI et Theologis A** (1994). Ethylene biosynthesis and action: A case of conservation.- *Plant Mol. Biol.* **26**: 1579-1597.

**Zegzouti H, Marty C, Jones B, Bouqin T, Latché A, Pech JC et Bouzayen M** (1997). Improved screening of cDNAs generated by mRNA differential display enables the selection of true positives and the isolation of weakly expressed messages.- *Plant Mol. Biol. Rep.* **15**: 236-245.

**Zhou D, Kalaitis P, Mattoo AK et Tucker ML** (1996). The mRNA for an ETR1 homologue in tomato is constitutively expressed in vegetative and reproductive tissues.- *Plant Mol. Biol.* **30**: 1331-1338.

***Annexes***

**MINI-EXTRACTION DE PLASMIDE (pour un échantillon)**(Sambrook *et al.*, 1989)**REACTIFS :**

<b>TE (Tris-EDTA) 10X</b>	<b>Solution I (GET)</b>	<b>Solution II</b>	<b>Solution III</b>
Tris HCl 100 mM pH 8	Tris-HCl 25 mM pH 8.0	NaOH 0,2N	Potassium acétate 3M
EDTA 10 mM pH 8	EDTA 10 mM pH 8.0	SDS 1%	Acide acétique glacial 5M
	Glucose 50 mM		
Autoclaver puis conserver au frigo		A préparer le jour même	Autoclaver et conserver au frigo

Lysozyme

Rnase Dnase free (10mg/ml)

Isopropanol pur à température ambiante

Ethanol 70 % à température ambiante

**MATERIELS :**

5ml LB liquide

Boîtes de pétrie LB/ampiciline

Tubes eppendorf 1.5 ml autoclaves

**PREPARATIFS (à effectuer la veille):**

Mettre en culture les bactéries dans 5 ml de milieu LB liquide/ (antibiotique ad hoc)

Sortir la solution I du frigo

**MANIPULATIONS**

- 1) Culoter les en centrifugeant à 20°C 1.5 ml de suspension bactérienne, 10000 rpm 5 min.
- 2) Eliminer le surnageant par aspiration (pompe à vide) ou à la pipette.
- 3) Ajouter 100 µl de solution I contenant 3.3 mg/ml de lysozyme et resuspendre le culot bactérien à la pipette.
- 4) Ajouter 200µl de solution II, mélanger en inversant plusieurs fois le tube et placer dans la glace 10 min.
- 5) Ajouter 150µl de solution III, mélanger au vortex et incubé 10min dans la glace.
- 6) Centrifuger 13000 rpm 10 min à 4°C et récupérer le surnageant (environ 450µl).
- 7) Ajouter 0.6 volume d'isopropanol mélanger au vortex et icuber 15 min ) température ambiante.
- 8) Centrifuger 13 000 rpm 15 min à température ambiante et récupérer la phase aqueuse.
- 9) Rincer le culot 1 fois dans de l'éthanol 70% et centrifuger 5 min à température ambiante.
- 10) Sécher le culot 10 à 15 min sous la hotte.
- 11) Reprendre le culot dans 50 à 100 µl de TE 1X contenant 1µg/µl de Rnase Dnase free.

Utiliser 10 à 15 µl pour une digestion et 0.5 à 1 µl pour une PCR

**SYMBOLE DU CODE IUB (International Units of Biochemistry)**

R = A, G	M = A, C	W = A, T	K = G, T	S = G, C	Y = C, T
H = A, T, C	B = G, T, C	D = G, A, T	V = G, A, C	N = A, G, C, T	I = inosine

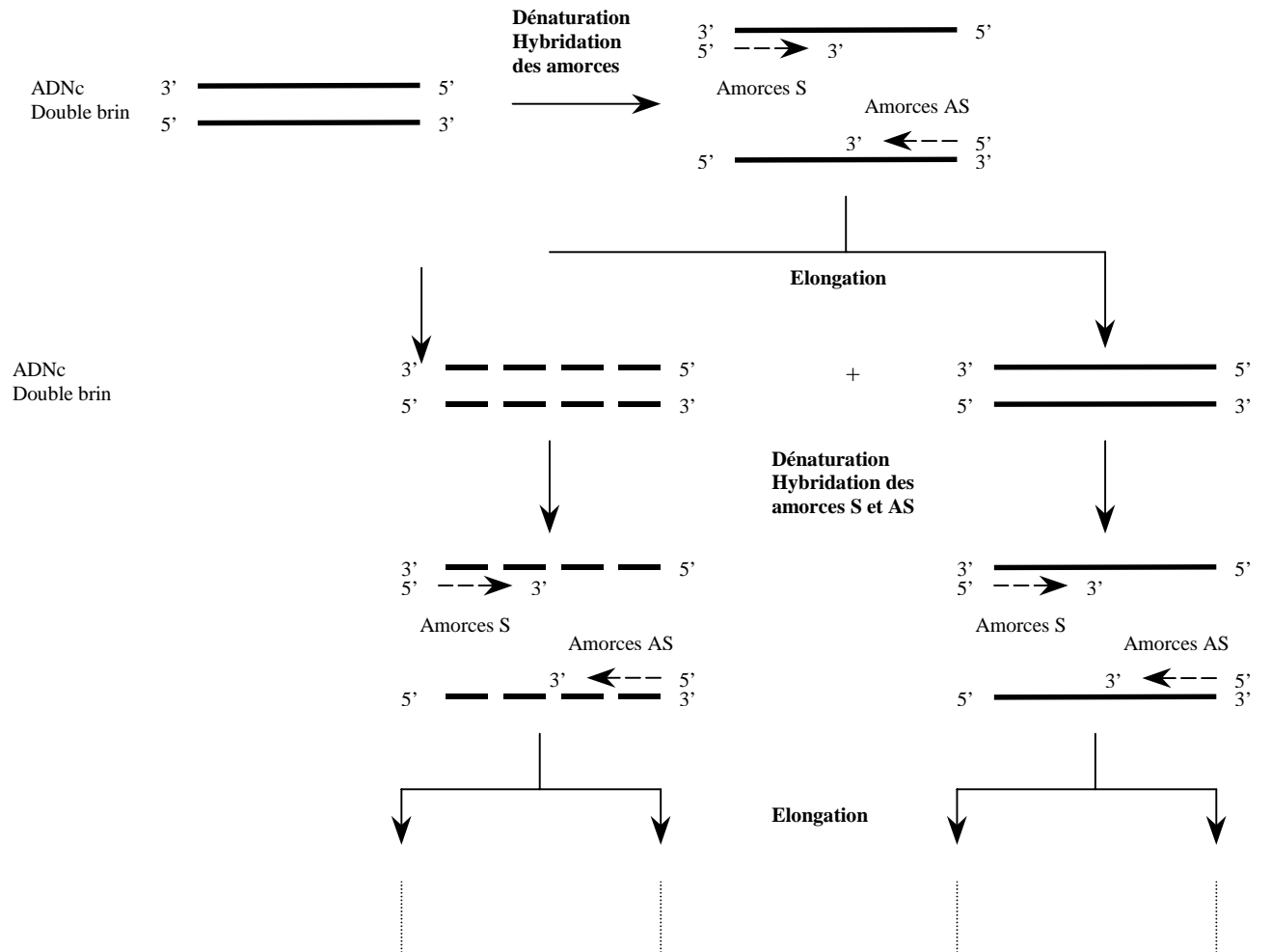
**CODE GENETIQUE**

Acide Aminé	Abréviation	Symbole	PM	Dégénéré	Nb de codons
Alanine	Ala	A	89	GCN	4
Arginine	Arg	R	174	CGN + AGR = MGN	6
Asparagine	Asn	N	132	AAY	2
Acide Aspartique	Asp	D	133	GAY	2
Asparagine ou Acide Aspartique	Asx	B	-		
Cystéine	Cys	C	121	TGY	2
Glutamine	Gln	Q	146	CAR	2
Acide Glutamique	Glu	E	147	GAR	2
Glutamine ou Acide Glutamique	Glx	Z	-		
Glycine	Gly	G	75	GGN	4
Histidine	His	H	155	CAY	2
Isoleucine	Ile	I	131	ATH	3
Leucine	Leu	L	131	TTR + CTN = YTN	6
Lysine	Lys	K	146	AAR	2
Méthionine	Met	M	149	ATG	1
Phénylalanine	Phe	F	165	TTY	2
Proline	Pro	P	115	CCN	4
Sérine	Ser	S	105	TCN + AGY = WSN	6
Thréonine	Thr	T	119	ACN	4
Tryptophane	Trp	W	204	TGG	1
Tyrosine	Tyr	Y	181	TAY	2
Valine	Val	V	117	GTN	4

**HOMOLOGIE ENTRE ACIDES AMINES**

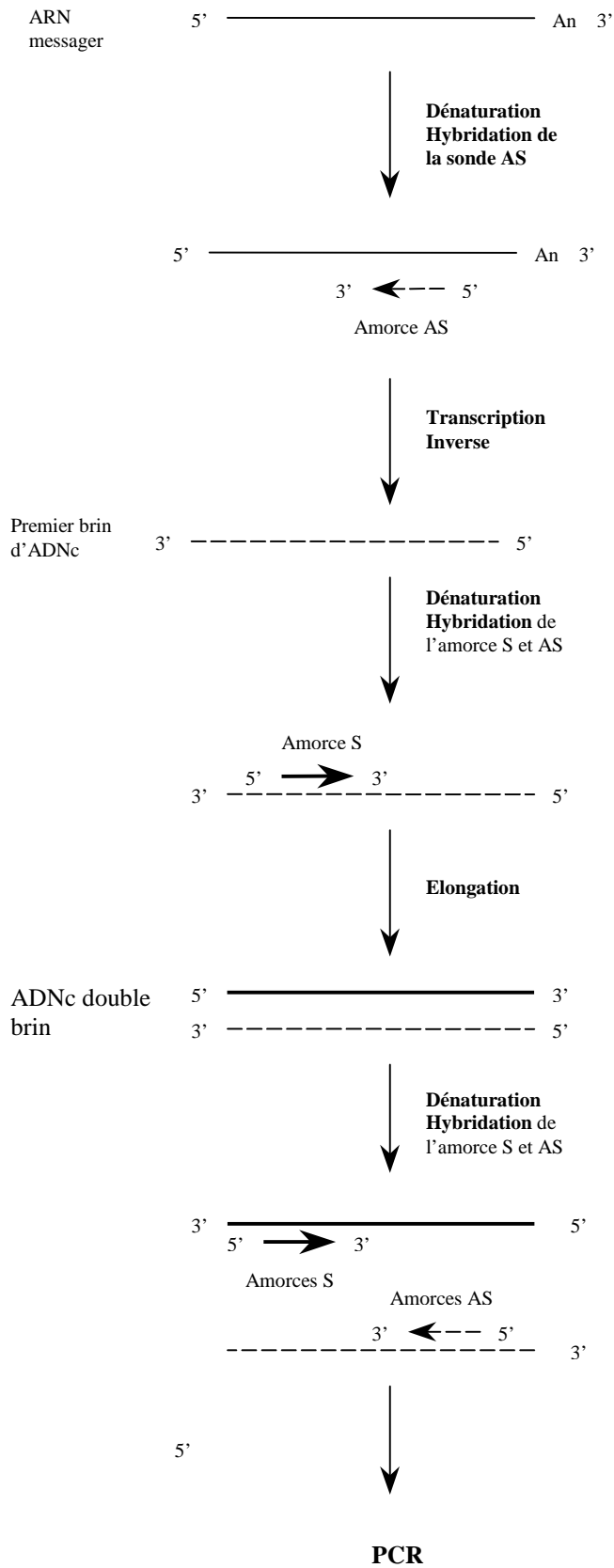
A = S	K = E ; K = Q ; K = R	S = A ; S = N ; S = T
D = E ; D = N	L = I ; L = M ; L = V	T = S
E = D ; E = K ; E = Q	M = I ; M = L ; M = V	V = I ; V = L ; V = M
F = Y	N = D, N = H ; N = S	W = Y
H = N ; H = Y	Q = E ; Q = K ; Q = R	Y = F ; Y = H ; Y = W
I = L ; I = M ; I = V	R = K ; R = Q	

**PRINCIPE DE LA TECHNIQUE DE PCR**

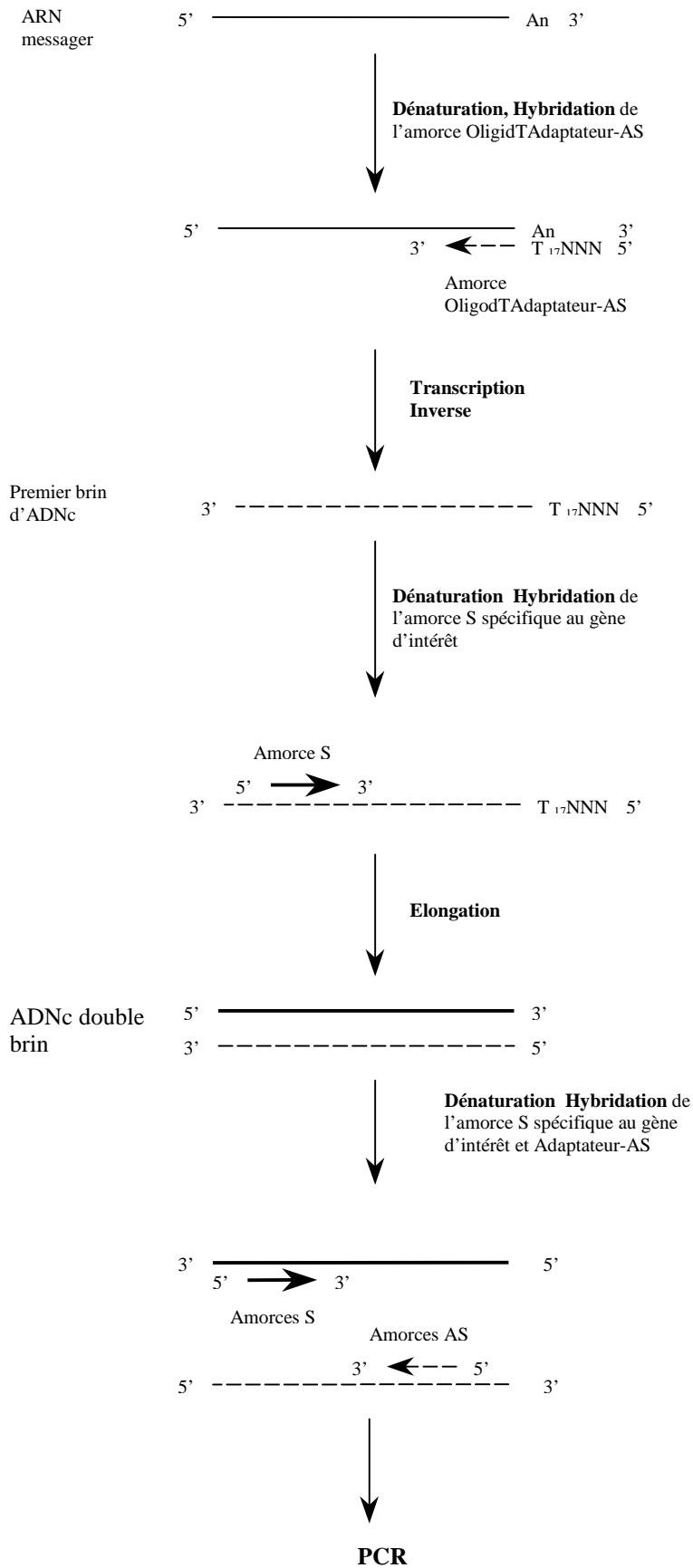




**PRINCIPE DE LA TECHNIQUE DE TRANSCRIPTION INVERSE**



**PRINCIPE DE LA TECHNIQUE DE 3'RACE-PCR**



**EXCISION in vivo DE PHAGE (pour un clone)**

(Kit  $\lambda$ -UNIZAP, Stratagene)

**REACTIFS :**

Ampicilline (50 à 60 mg/ml).  
Chloroforme pur.  
IPTG (Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside) à 100 mM.  
Maltose 20 %.  
MgSO<sub>4</sub> 1M.  
Milieu LB agar (400 ml) autoclavé  
Milieu LB liquide (400 ml) autoclavé.  
Tampon SM (NaCl 0.25M, MgSO<sub>4</sub> 8 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7.5, gélatine 0.01 %) autoclavé.  
X-GAL (5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) à 40 mg/ml.

**MATERIELS :**

Un tube Polycarbonate de 50 ml.  
Un tube Falcon de 15ml.  
Trois petites boîtes de Pétri.  
Trois tubes Eppendorf de 1.5 ml.  
Ex Assist helper phage (1.0 x10<sup>6</sup> pfu/ml).  
Bactéries XL1-Blue MRF<sup>r</sup>.  
Bactéries SOLR.

**PREPARATIFS (à effectuer la veille) :**

- 1) Carotter la plage de lyse d'intérêt et la transférer dans un tube Eppendorf stérile contenant 500  $\mu$ l de tampon SM et 20  $\mu$ L de chloroforme.
- 2) Mélanger au vortex et laisser 1 à 2h à température ambiante ou une nuit à 4°C.
- 3) Mettre en culture à 37°C sous agitation les bactéries :
  - XL1-Blue MRF<sup>r</sup> dans le milieu LB liquide contenant 0.2 % de maltose et 10 mM de MgSO<sub>4</sub>,
  - SOL R dans le milieu LB liquide uniquement.
- 4) Fondre le milieu LB agar, laisser au moins 1h à 55°C, ajouter l'équivalent en  $\mu$ l d'ampicilline (concentration finale 50  $\mu$ g/ml) et couler les boîtes de Pétri.

**MANIPULATIONS**

- 12) Culotter les bactéries XL1-Blue MRF<sup>r</sup> et SOLR par centrifugation (1000 g). Resuspendre les bactéries dans 10 mM de MgSO<sub>4</sub> de manière à avoir une DO<sub>600</sub> = 1.
- 13) Dans un tube polycarbonate de 50ml, mettre dans l'ordre :
  - 200  $\mu$ l de bactéries XL1-Blue MRF<sup>r</sup> à DO<sub>600</sub> = 1,
  - 250  $\mu$ l de la suspension de phage à exciser,
  - 1  $\mu$ l de Ex Assist helper phage (1.0 x10<sup>6</sup> pfu/ml).
- 14) Incuber 15 min. à 37 °C.
- 15) Ajouter 3 ml de milieu LB liquide et incuber 2h 30min à 3h à 37°C sous agitation. L'incubation peut se prolonger toute la nuit sans aucun problème.
- 16) Chauffer le tube 20 min. à 65-70°C et centrifuger 15 min. à 1000g.
- 17) Récupérer le surnageant dans un tube Falcon de 15 ml. Celui-ci peut être gardé 1 à 2 mois à 4°C.
- 18) Dans 2 tubes Eppendorf, ajouter dans chacun :
  - 200  $\mu$ l de bactéries SOLR à DO<sub>600</sub> = 1,
  - respectivement 1, 10 du surnageant précédent.
- 19) Incuber 15 min. à 37 °C.
- 20) Etaler sur une boîte de pétrie 25  $\mu$ l de X-Gal (40 mg/ml), 25  $\mu$ l d'IPTG (100 mM) et respectivement :
  - 20  $\mu$ l du mélange (200 $\mu$ l de bactéries + 10 $\mu$ l de surnageant),
  - 10  $\mu$ l du mélange (200 $\mu$ l de bactéries + 10 $\mu$ l de surnageant),
  - 10 $\mu$ l du mélange (200 $\mu$ l de bactéries + 1 $\mu$ l de surnageant).
- 21) Incuber les boites une nuit à 37°C.

**CRIBLAGE PRIMAIRE D'UNE BANQUE D'ADN complémentaires PAR SONDE D'ADNc MARQUEE :**  
**PREPARATION DE LA MEMBRANE DE NYLON CHARGEE POSITIVEMENT**

**Attention**, prend 30 minutes par couple de membranes après refroidissement du Top agar (soit 4 heures continues pour un criblage primaire de 6 boîtes à partir de la fin de croissance des phages).

- 1) Repérer le moment où l'on commence à voir les minuscules plages de lyse sur la boîte. A ce moment là, passez l'étuve à 37 °C (elle était à 42°C).
- 2) Continuez à laisser pousser les phages jusqu'à ce que les plages de lyse soient presque confluentes (elles ne doivent pas être confluentes).
- 3) Placer les boîtes au moins 1 heure à 4 °C de façon à ce que le Top agar ne colle pas aux membranes.
- 4) Pendant ce temps,
  - Préparer les solutions de dénaturation comme suit :
    - Solution de dénaturation (20 ml par membrane)
      - + 1,5 M NaCl
      - + 0,5 M NaOH
    - Solution de neutralisation (40 ml par membrane)
      - + 1,5 M NaCl
      - + 0,5 M Tris-HCL pH 7,2
      - + 1 mM EDTA
    - Solution de lavage (20 ml par membrane)
      - + 2X SSC
  - Découper des disques en papier Whatman 3 M d'un diamètre légèrement supérieur à celui des membranes (diamètre du couvercle d'une grande boîte de Pétri) (3 disques par membrane).
  - Pour chaque boîte, il faudra faire un réplikat. Numéroté donc deux membranes de nylon<sup>+</sup> du même numéro que la boîte sur laquelle poussent les phages ainsi : numéro « First » et numéro « Réplikat ». Faire une petite encoche en triangle dans la membrane pour la repérer par la suite.
- 5) Faire tremper autant de disques de papier Whatman 3 M que de membranes dans la solution de dénaturation dans un plat pyrex.
- 6) Faire tremper le double de disques de papier Whatman 3 M que de membranes dans la solution de neutralisation dans un plat pyrex.
- 7) Numéroté deux couvercles stériles de grande boîte de Pétri FD et RD et 4 autres couvercles stériles FN1, FN2, RN1 et RN2

Pour la suite, procéder membrane par membrane
- 8) Placer 2 disques imbibés de la solution de dénaturation et égouttés dans les couvercles FD et RD et 4 disques imbibés de la solution de neutralisation et égouttés dans les couvercles FN1, FN2, RN1 et RN2.
  - 9) Placer la membrane « First » sur la boîte refroidie en respectant les précautions suivantes :
    - toujours tenir la membrane avec des gants,
    - la tenir par les deux bords, la courber et la déposer par le milieu de la boîte en faisant retomber doucement les bords. Il faut que la face portant la numérotation de la membrane soit placée contre le Top agar.
    - Laisser en contact pendant 4 minutes
    - pendant ce temps, faire trois trous dissymétriques à travers la membrane et le milieu de culture avec une aiguille stérile chargée en encre de chine noire de façon à pouvoir orienter la membrane sur la boîte plus tard pour le prélèvement des clones positifs. ATTENTION : si ça n'est pas fait tout le travail risque de devenir inutilisable !!!
- 10) Placer la membrane « First », la face « plages de lyse » en l'air, sur le disque de papier Whatman 3 M préalablement imbibé de solution de dénaturation et placé dans le couvercle FD pendant 7 minutes.
- 11) Placer la membrane « Réplikat » sur la boîte de phages en faisant comme en 9) mais en la laissant 8 minutes sur la boîte.
- 12) Placer la membrane « Réplikat », la face « plages de lyse » en l'air, sur le disque de papier Whatman 3 M préalablement imbibé de solution de dénaturation et placé dans le couvercle RD pendant 7 minutes.
- 13) Placer la membrane « First », la face « plages de lyse » en l'air, sur le disque de papier Whatman 3 M préalablement imbibé de solution de neutralisation et placé dans le couvercle FN1 pendant 3 minutes.
- 14) Placer la membrane « Réplikat », la face « plages de lyse » en l'air, sur le disque de papier Whatman 3 M préalablement imbibé de solution de neutralisation et placé dans le couvercle RN1 pendant 3 minutes.
- 15) Placer à nouveau la membrane « First », la face « plages de lyse » en l'air, sur un nouveau disque de papier Whatman également imprégné de solution de neutralisation et placé dans le couvercle FN2 pendant 3 minutes.
- 16) Laver la membrane « First » dans 20 ml de 2X SSC dans une boîte de pétri pendant 1 minute et 30 secondes en vérifiant qu'il n'y ait pas de débris restants, et transférer la membrane, la face « plages de lyse » en l'air sur du papier Whatman 3 M. Laisser sécher ainsi.
- 17) Placer à nouveau la membrane « Réplikat », la face « plages de lyse » en l'air, sur un nouveau disque de papier Whatman également imprégné de solution de neutralisation et placé dans le couvercle RN2 pendant 3 minutes.
- 18) Laver la membrane « Réplikat » dans 20 ml de 2X SSC dans une boîte de pétri pendant 1 minute et 30 secondes en vérifiant qu'il n'y ait pas de débris restants, et transférer la membrane, la face « plages de lyse » en l'air sur du papier Whatman 3 M. Laisser sécher ainsi.

- 19) Jeter les différents disques de papier Whatman, vider et égoutter les couvercles pour les réutiliser si besoin de refaire la même chose pour d'autres membranes.
- 20) Procéder ainsi pour tous les couples de membranes. Attention, il est donc nécessaire de prévoir 30 minutes par couple de membranes (« First + Réplicat ») depuis le transfert jusqu'à la préparation pour fixation de l'ADN (soit 3 heures pour 6 boîtes de phages pour un criblage primaire).
- 21) Une fois sèche, placer chaque couple de membranes dans un étuit en papier Whatman 3 M et cuire au four 2 heures à 80 °C.
- 22) Garder la boîte des phages à 4 °C en la fermant bien avec du parafilm.
- 23) Une fois la membrane cuite, crosshybrider aux UV comme suit : 0,16J/cm<sup>2</sup>, ADN face aux UV.
- 24) La membrane est prête. elle peut être gardée au moins 6 mois à 4 °C.

**ENSEMBLE DES GENES ISOLES DU FRUIT**

Clones	n° d'accension	Taille bp	ADNc complet	Homologie	Fonctions hypothétiques
PA-ACO	AF026793	1235	oui	ACC oxydase	Synthèse d'éthylène
PA-ACS1	AF184076	894	non	ACC synthase	
PA-ACS2	AF184077	1164	non	ACC synthase	
PA-ACS3	AF184078	1104	non	ACC synthase	
p69RF	AF139500	1280	non	Protéine E8	
PA-PME	AF184079	746	non	Pectineméthyl estérase	Métabolisme des parois
PA-βGAL	AF184080	1467	non	β-galactosidase	
PA-EXP1	U93167	1019	oui	Expansine	
PA-EXP2	AF038815	1252	oui	Expansine	
pAPRI08	U82433	1012	non	d-TDP-glucose déshydratase	Métabolisme des sucres
pAPRI34	U93272	1014	non	Ppi diphosphofruktokinase	
pAPRI51	AF000952	2065	oui	Transporteur d'hexoses	
AMYB	AF139501	1580	non	β-amylase	
pAPRI05	U82011	1257	oui	Méthyltransférase	Métabolismes secondaires
PA-PPO	AF020786	2070	oui	Polyphénoloxydase	
PA-ZE	AF071888	2323	oui	Zéaxanthine époxydase	
ZEAEOX2	AF159948	2023	oui	Zéaxanthine poxydase(clone2)	
pAPRI13	U93271	1022	non	Enoyl CoA hydratase	Métabolisme des lipides
pAPRI86	AF071892	1219	non	Acide gras désaturase	
pAPRI15	U82330	1305	oui	Adénylate kinase	Synthèse des nucléotides pyrimidiques
pAPRI31	U95179	636	non	Azote réductase	Métabolisme de l'azote
pAPRI32	U97494	691	oui	Métallothionéine	Fixation des métaux lourds
pAPRI61	AF071890	1425	non	Sulfite réductase	Métabolisme des sulfites
pAPRI35	U93165	778	oui	Protéine Allergène	Allergies
	AF134731	778	oui	Protéine Allergène (clone 2)	Allergies
pAPRI52	U93166	1444	oui	Cystéine protéinase	Dégradation des protéines
pAPRI56	AF008910	651	non	Ubiquitine	Dégradation des protéines
pAPRI41	U93164	976	oui	Protéine ASR	Défense contre le stress hydrique
TRP	AF071895	300	non	Protéine de turgescence	Défense contre le stress hydrique
pAPRI75	AF071894	993	non	Protéine LEA	Pression osmotique
pAPRI77	AF071893	1005	non	Protéine AP2	Facteurs de transcription
HBLZP	AF139497	1127	oui	Homéobox leucine zipper	Facteurs de transcription
PA-MAPK	AF134730	1470	oui	MAP Kinase protéine	Transduction du signal
PA-CALRET	AF134733	1524	oui	Calcium binding protein	Transduction du signal second messenger
pAPRI60	AF071889	1049	oui	40S Protéine ribosomique S8	Structure du ribosome
pAPRI72	AF071891	1086	oui	40S Protéine ribosomique S4	Structure du ribosome
pAPRI39	U93168	790	oui	Protéine ribosomique L12	Structure du ribosome
PA-60SRIBPROL1	AF134732	1552	oui	60S protéine ribosomale L1	Structure du ribosome
pAPRI07	U82219	987	oui	RAB7 GTP binding protein	Trafic vésiculaire, endosomes tardifs
mPOR	AF139498	1119	oui	Porine	Structure des parois
Ribo25S	AF003997	450	non	Gène ribosomique	
pAPRI12	U82760	1810	oui	LEC 14-B protein	Inconnue
pAPRI26	U93273	776	oui	Auxin/cytokine-repressed protein	
p85RF	AF139499	1031	oui	Inconnue	
p78RF	AF139496	890	oui	Inconnue	
pAPRI50	U97530	1318	oui	Dioxygénase	

## **Cloning of Two cDNA Clones Encoding Two Different Expansins From Apricot Fruit (*Prunus armeniaca*). Gene Expression During Fruit Ripening and After Post-harvest Treatments by Air, Carbon Dioxide, Ethylene, and 1-Methyl Cyclopropene.**

**Didier Mbégué-A-Mbégué, Barbara Gouble, Jean-Marc Audergon, Guy Abagnac, Rose-Marie Gomez and Bernard R. Fils-Lycaon\***

Institut National de la Recherche Agronomique, Site Agroparc, Domaine Saint Paul, Station de Technologie des Produits Végétaux, 84914 Avignon cedex 9, France (D.M.-A.-M, B.G., G.A.); Institut National de la Recherche Agronomique, Site Agroparc, Domaine Saint Paul, Station d'Amélioration des Fruits et Légumes, 84914 Avignon cedex 9, France (J.-M.A.); and Institut National de la Recherche Agronomique, Domaine de Duclos, Station de Technologie des Produits Végétaux, 97170 Petit-Bourg, Guadeloupe, French West Indies (R.-M.G, B.R.F.-L)

\*Corresponding author: Telephone: (33) 4 32 72 24 97 Fax: (33) 4 32 72 24 62  
Email: [lycaon@antilles.inra.fr](mailto:lycaon@antilles.inra.fr)

### **FOOTNOTES**

This work was supported by a grant from the ministry of Education and Research of France

\*Corresponding author; e-mail [lycaon@antilles.inra.fr](mailto:lycaon@antilles.inra.fr); fax 590-25-54-15

Abbreviations : CO<sub>2</sub>, carbon dioxide; DAA, day after anthesis; EXP, expansin; 1-MCP, 1-methyl cyclopropene

### **ABSTRACT**

A partial cDNA clone, encoding a protein homologous to expansin (*EXP*), has been randomly isolated from a ripe apricot-fruit (*Prunus armeniaca* var Bergeron) cDNA library. This clone was used to isolate two full-length *EXP* cDNAs, *Pa-Exp1* (accession no. U93167) and *Pa-Exp2* (accession no. AF038815) from the same cDNA library. The predicted polypeptides encoded by these two cDNAs are different and belong to the  $\alpha$ -expansin family. *Pa-Exp1* and *Pa-Exp2* are encoded by two different members of a multigene family. These two clones are essentially expressed in fruit, during its ripening. *Pa-Exp1* mRNAs accumulated abundantly at half-ripe stage of fruit development and decreased then after. *Pa-Exp2*-mRNA level increased from immature-green stage to half-ripe stage where it peaked before to decrease then after. The time course of *Pa-Exp1*- and *Pa-Exp2*-gene expression is similar to fruit growth occurring throughout ripening process. Post-harvest treatments by air, ethylene, 1-methyl cyclopropene and carbon dioxide let us to conclude that, although the maximum of *Pa-Exp1* and *Pa-Exp2* expression occurs after the beginning of ethylene emission, both genes are finally unlikely to be induced by ethylene, and are likely to be under developmental control. Additionally, both genes, but particularly *Pa-Exp1*, appear to be down-regulated by induced high concentrations of ethylene.

## INTRODUCTION

Ripening of apricot fruit is characterized by many biochemical and physiological changes. These changes result in particular, in alterations in color and texture, and in the accumulation of compounds that improve the taste and flavor. Despite the economic importance of apricot (*Prunus armeniaca*) fruit in Europe, the biochemical and molecular changes which underlie the ripening process of this climacteric fruit are poorly understood. In contrast, the understanding of molecular and biochemical changes associated with the ripening process of other fruits such as tomato has reached the stage where manipulation of the expression of genes has shown to greatly alter ripening physiology, and improve shelf life and processing characteristics of the fruit (Grierson and Schuch, 1993). In an effort to gain some insight into the expression of ripening-associated genes of apricot fruit during its ripening process, cDNA libraries have been constructed and used to identify changes in the expression of ripening-associated genes. The first cDNA clones of apricot fruit identified in our laboratory encoded a Rab7 small GTP-binding protein (Mbéguié-A-Mbéguié et al., 1997a), an O-methyltransferase (Mbéguié-A-Mbéguié et al., 1997b), a metallothionein-like protein (Mbéguié-A-Mbéguié et al., 1997c), an abscisic acid-, stress-, ripening-induced (ASR)-like protein (Mbéguié-A-Mbéguié et al., 1997d), a cysteine protease (Mbéguié-A-Mbéguié et al., 1997e), ACC oxidase (Mbéguié-A-Mbéguié et al., 1999), and polyphenol oxidase (Chevalier et al., 1999). A partial cDNA clone encoding a protein homologous to expansin (*EXP*) has also been randomly isolated from our ripe apricot fruit cDNA library. It is at the basis of the present work.

Among the events occurring during fruit ripening are cell wall modifications and fruit softening (Brady, 1987). Softening occurring during ripening resulted in the disassembly of hemicellulose and pectin polymers. This generally undergoes substantial wall-compound depolymerization and polyuronide solubilization, thereby leading to a general loss of cohesion of the tissue (Gross and Wallner, 1979; Grierson and Tucker, 1983; Huber, 1983). This aspect of fruit ripening has been considered to be mediated by cell wall hydrolase enzymes, including polygalacturonase, pectinmethylesterase and cellulase. This model was supported by anatomical works that demonstrated the breakdown of cell wall polymers (Ben-Arie et al., 1979; Gross and Wallner, 1979; Ahmed and Labavitch, 1980; Gross, 1984; Sakurai and Nevins, 1997; Gallego and Zarra, 1997). Molecular studies also demonstrated the increase of gene expression encoding for some putative cell wall polysaccharide hydrolases as well as the activities of some of these enzymes during ripening (Fischer and Bennett, 1991; Fils-lycaon and Buret, 1991; Lazan et al., 1995; Bonghi et al., 1996; Ketsa and Daengkanit, 1999). However, these enzymes can be genetically altered without major effect on fruit softening as shown by antisens RNA, and chimeric gene expression strategies (Smith et al., 1988; Sheehy et al., 1988; Giovannoni et al., 1989; Tieman et al., 1992; Hall et al., 1993; Lashbrook et al., 1998). This has led to view alternative mechanisms and/or research new enzymes that could be involved in fruit softening. Expansin protein could be one of these enzymes. Recently, it has been suggested to contribute in fruit softening through the cell wall disassembly during ripening process (Rose et al., 1997; Rose and Bennett, 1999; Brummell et al., 1999a). This protein has been firstly identified in vegetative tissues including seed cucumber (McQueen-Mason et al., 1992), oat coleoptile (Li et al., 1993), tomato leaves (Keller and Cosgrove, 1995) and rice (Cho and Kende, 1997a). This enzyme has been shown to induce plant cell enlargement by disrupting non covalent linkages such as hydrogen bonds between cellulose and hemicellulose without any cell wall hydrolytic activity (McQueen-Mason and Cosgrove, 1994; Cosgrove, 1996; 1998).



In this paper, starting our work from a partial cDNA clone of expansin randomly isolated from our ripe fruit cDNA library, we report the identification of two complete cDNAs, *Pa-Exp1* and *Pa-Exp2*, encoding two different expansins from apricot fruit. Expression of these two cDNAs has been investigated during fruit ripening and after post-harvest treatments such as air, carbon dioxide (CO<sub>2</sub>), ethylene and 1-methyl cyclopropene (1-MCP treatments). According to their subsequent pattern of expression, the putative role of ethylene in regulation of *Pa-Exp1* and *Pa-Exp2* genes is also discussed.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material and treatments

The apricot (*Prunus armeniaca* var Bergeron) was used in all the experiments. Experiments have been made with fruits harvested two different years. In 1995, fruits were harvested at the immature-green-1 and -2, mature-green, straw-yellow (breaker), light-orange (breaker +), orange (half-ripe), deep-orange-1 (fully ripe) and deep-orange-2 (over-ripe) stages (89, 96, 103, 110, 117, 124, 128, and 131 days, respectively, after anthesis (DAA)), at Gotheron, near Valence, France. At each harvest date, immediately after picking, we formed random and equivalent lots, each with 30 fruits. Fruits of two lots were cut into small pieces, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C for subsequent RNA analysis. Two other lots were immediately used for firmness and ethylene production measurements. Another lot was divided by two and 15 apricot fruits were stored for 6 days at 10°C in a controlled atmosphere of either humidified air or a mixture of 10% CO<sub>2</sub> / 20% O<sub>2</sub> / 70% N (v/v).

Ethylene and 1-MCP, plus air treatments have been performed on fruits harvested in 1998 at the same place, 106, 111, 113 and 115 DAA, respectively. Four lots of 5 fruits each were made randomly at each of these four ripening stages. Control fruits were cut in small pieces, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C for subsequent RNA analysis. Untreated fruits were kept on air in an unsealed jar at 23°C. Treated fruits were sealed in a 18 liter glass jar fitted with a rubber stopper. For ethylene treatment, approximately 20  $\mu\text{L.L}^{-1}$  of gas were in air as fruits let in air. For 1-MCP treatment, at least 1  $\mu\text{L.L}^{-1}$  was injected every day during all the experiment. Ethylene emission of all fruits was monitored every two days after a 1.5 h confinement for air and ethylene-treated fruits, and by direct taking for 1-MCP-treated fruits until a markedly difference in this gas production was observed between ethylene-treated fruits and fruits let in air. This occurred after 7 days for fruits harvested at 106 DAA, 5 days for those harvested at 111 and 113 DAA, and 4 days for those harvested 115 DAA. At the end of treatments, fruits were cut in small pieces, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C for subsequent RNA analysis.

Young leaves, flowers, seeds and stems were harvested from the same trees and immediately frozen in liquid nitrogen before storage at -80°C.

### Ethylene and Firmness Measurements

Ethylene production of fruits was measured at a constant room temperature of 23°C according to Chambroy et al. (1995). While fruit stored in air or treated by ethylene and 1-MCP were directly used for ethylene measurement, fruits that were stored under controlled atmosphere (10% CO<sub>2</sub> (v/v) at 10°C) were kept few minutes at room temperature to homogenize at 23°C, before each measurement.

Firmness was measured with a PENELAUP system (Abbal and Planton, 1990). It corresponded to the maximal force needed to compress 3% of the fruit initial height.

### **Total RNA Extraction and Purification, and Poly(A+)-Rich RNA Preparation**

We extracted and purified total RNAs from frozen young leaves, flowers and stems according to the method of Fils-Lycaon et al. (1996).

Total RNAs were extracted from fruit according to the method of Mbéguié-A-Mbéguié et al. (1999) and purified on cellulose CC 41 (Whatman) according to the method of Fils-Lycaon et al. (1996).

We used a PolyATtract mRNA isolation system (Promega, Lyon, France) to obtain Poly(A+)-rich RNAs. Total RNAs were passed through an oligo(dt) cellulose column, and poly(A+)-rich RNAs were eluted as described by the manufacturer.

### **Construction of the cDNA Library of Ripe Fruit**

A UNI-ZAP XR (Stratagene, Saint Quentin en Yvelines, France) cDNA library was prepared from 5  $\mu\text{g}$  of ripe apricot poly(A+), containing RNAs as described by the manufacturer. The number of independent recombinants generated was  $6 \times 10^6$ . The average size of the cloned cDNA was estimated at 1.2 kb using PCR analysis of individual plaques.

### **UNI-ZAP XR cDNA Library DNA Screening and Clone Analysis**

A partial cDNA encoding Expansin was randomly isolated from our ripe apricot fruit cDNA library. This cDNA was randomly labeled to high activity with [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ] dCTP, using a Ready-to-Go cDNA labeling kit (Pharmacia, Orsay, France) as described by the manufacturer. We used this probe to screen  $2.16 \times 10^5$  recombinant plaques of our cDNA library by in-situ plaque hybridization (Sambrook et al., 1989). Duplicate plaque lifts were made with a Nytran<sup>+</sup> membrane (Schleicher and Schuell, Cera-Labo, Ecquevilly, France), and the DNA was fixed by baking at 80°C for 2 h and treatment with UV. The membranes were prehybridized at 40°C for 2 h in a prehybridization buffer solution containing 40% (v/v) formamide, 5X SSC (20X SSC = 3 M sodium chloride and 0.3 M sodium citrate, pH 7.0), 2X Denhardt's reagent (0.2 g of Ficoll, 0.2 g of PVP, and 0.2 g of BSA), 0.5% (w/v) SDS, and 100  $\mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$  denatured salmon-sperm DNA. Hybridization was performed overnight at 40°C with fresh prehybridization solution, supplemented with the labeled probe. Hybridized membranes were washed in 2X SSC-1% (w/v) SDS, twice at 40°C for 20 min, and twice at 45°C for 20 min, before being autoradiographed overnight at -80°C, using KODAK X-AR films and an intensifying screen.

Several positive clones were plaque-purified and subcloned by the Zap procedure (Stratagene). Eurogentec then fully sequenced both DNA strands of each clone.

### **Sequence Analysis**

We used the advanced BLAST program (Altschul et al., 1997) to search the nonredundant peptide sequence database on the National Center for Biotechnology Information BLAST E-mail server (National Library of Medicine, Bethesda, MD).

We determined the molecular mass of the deduced polypeptides using the Genetics Computer Group software of the University of Wisconsin (Devereux et al., 1984). The protein sequences were aligned with the MultAlin program of Corpet (1988). The location of the signal peptide cleavage sites was determined with SignalP program (Nielsen et al., 1997). The putative functional motifs of predicted polypeptides was determined with ScanProsite program (Hofmann et al., 1999). The localization of the predicted polypeptides was estimated with the PSORT prediction program.

### Preparation of Expansin-Gene Specific-Probes

Gene specific-probes of *Pa-Exp1* and *Pa-Exp2*, of approximately 250 and 400 bp, respectively, were generated by PCR amplification of the 3'- untranslated regions of genes, and named *Pa-Exp1-3'* and *Pa-Exp2-3'*, respectively. The following primers: 5'-CTCAGGGGGTCAATTTTAGAG-3' (for *Pa-Exp1* specific probe) and 5'-AAGGTCTGGAAGAAATGGCG-3' (for *Pa-Exp2* specific probe) were designed and associated with the universal primer T7 in PCR amplification. Plasmid containing the full length cDNA of *Pa-Exp1* or *Pa-Exp2* was used as a template in a reaction mixture of 10 mM Tris-HCl, pH8.3, 50 mM KCl, 0.2  $\mu$ M dNTPs, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5  $\mu$ M of each primer and 1 U of AmpliTaq polymerase (Perking Helmer, Courtaboeuf, France). PCR parameters were 30 s denaturation at 94°C, 30 s annealing at 46°C and 2 min elongation at 72°C for 40 cycles.

### Southern-Blot Analysis

We prepared genomic DNA from young apricot leaves by modifying the method of Bernatzky and Tanksley (1986). Approximately 10  $\mu$ g of DNA was digested with *EcoR* I, *BamH* I, *HindIII* and *Sac* I restriction enzymes. DNA fragments were then separated on a 0.8% (w/v) agarose gel, depurinated in 0.25 N HCl for 1 h, denatured in 0.4 N NaOH for 1 h, and blotted to a Nytran<sup>+</sup> membrane (Schleicher and Schuell, Cera-Labo) by overnight capillary transfer in 0.4 N NaOH. Membranes were successively hybridized with *Pa-Exp1-3'*, *Pa-Exp2-3'*, and with a mixture of labeled full-length cDNAs of *Pa-Exp1* and *Pa-Exp2*. Conditions of prehybridization, hybridization, and autoradiography of blots were performed as described above for cDNA library screening. Hybridized membranes were washed in 2X SSC-1% (w/v) SDS, once at room temperature for 20 min, twice at 40°C for 20 min, and once at 45°C for 10 min.

### Northern-Blot Analysis

Fifteen micrograms of total RNA of fruit tissues taken at different ripening stages was separated on a 1.2% (w/v) agarose denaturing gel containing 10% (v/v) formaldehyde. After electrophoresis, the RNA was transferred to a Nytran<sup>+</sup> membrane (Schleicher and Schuell, Cera-Labo) by overnight capillary transfer in 20X SSC. Prehybridization, hybridization and autoradiography of the membrane were performed as described above for cDNA-library screening. Hybridized membranes were washed in 2X SSC-1% (w/v) SDS, twice at 40°C for 20 min, once at 45°C for 20 min, and once at 50°C for 20 min.

Membrane hybridized with labeled *Pa-Exp1-3'* were washed in 2X SSC-1% (w/v) SDS twice at 40°C for 20 min, once at 45°C for 20 min and once at 50°C for 20 min. Then this membrane was washed and probed again with labeled *Pa-Exp2-3'* as described above. The message level was quantified with a PhosphoImager (Molecular Dynamics, Essonne, FRANCE) and analyzed with the ImageQuant program (Molecular Dynamics).

For intact young leaves, flowers, roots, mature seeds and stems, *Pa-Exp1* and *Pa-Exp2* mRNAs were detected only by 3'RACE PCR according to Frohman et al. (1988). Reverse transcription of total RNA from each organ was performed with 50 U of Maloney murine leucaemia virus (M-MuLV) reverse transcriptase (Roche Molecular Biochemicals, Maylan, France) according to the manufacturer. Five  $\mu$ L of produced cDNA were used to amplify simultaneously the 3'-untranslated regions of *Pa-Exp1* and *Pa-Exp2* genes as described above for gene specific probe preparation. We used the same specific primers to generate the 3'-untranslated regions of *Pa-Exp1* and *Pa-Exp2* with following PCR conditions: 30 s denaturation at 94°C, 30 s annealing at 50°C and 2 min elongation at 72°C for 40 cycles. The PCR

products were analyzed in a 0.8% (w/v) agarose gel and transferred to a nylon membrane. The blot was simultaneously hybridized with *Pa-Exp1-3'* and *Pa-Exp2-3'* as described above with a final wash, twice in 1X SSC-1% (w/v) SDS at 50°C for 20 min. The blot was autoradiographed overnight at room temperature.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Ethylene Production and Fruit Softening During Ripening

Neither ethylene production nor softening (firmness value less than 125 N) was detected for fruit harvested at the immature-green and mature-green stages (Fig. 1). Traces of ethylene were detected at the breaker stage (110 DAA). Concomitantly, the firmness value fell to 100 N. The rate of ethylene production increased up to 10 nmol.kg<sup>-1</sup> of fresh weight.h<sup>-1</sup> at the breaker + stage (117 DAA). The maximum of ethylene production (45 nmol.kg<sup>-1</sup> of fresh weight.h<sup>-1</sup>) occurred at the ripe stage (127 DAA) and was associated with the maximum of fruit softening (firmness value of 9 N). Fruit size increased throughout development with a maximum reached at ripe stage (127 DAA) in association with ethylene production. Thus, our results are different from those generally observed in other fruits such as tomato where fruit reached full size at the mature-green stage before the onset of ripening (Gillaspy et al., 1993).

### Ethylene Production and Fruit Softening After Treatment By Air and High CO<sub>2</sub> Concentrations

Fruits harvested before 110 DAA did not have any ethylene production whatever the applied post-harvest treatment, CO<sub>2</sub> or air (Fig. 2A). Fruits harvested after this date already presented ethylene production just after harvest. When these fruits are CO<sub>2</sub>-treated, ethylene production stayed approximately at the control level. In contrast, fruits let in air had a production enhanced two to four fold. On another side (Fig. 2B), softening was better prevented by CO<sub>2</sub> treatments when fruits are harvested before 110 DAA. Same fruits let in air softened more quickly. For fruits harvested later, effect of CO<sub>2</sub> treatment is weaker.

It is well known that long term storage at high CO<sub>2</sub> concentration delayed ripening process of climacteric fruits including respiratory metabolism, ethylene biosynthesis, firmness and color changes (Kader, 1986; Kubo et al., 1990; Rothan and Nicolas, 1994; Wang, 1990; Del Cura et al., 1996). Similar storage conditions applied to apricot fruit taken at different ripening stages had also a striking effect on fruit development whereby ethylene biosynthesis and loss of firmness are reduced by comparison with fruits let in air. This results give an additional argument to the fact that apricot fruit undergoes a climacteric-like ripening process where ethylene plays a key regulatory role as we hypothesized before (Mbéguié-A-Mbéguié et al., 1999).

### Isolation of Two EXP-Related cDNAs

Firstly, a partial cDNA fragment of 700 bp was isolated randomly from our cDNA library of ripe apricot fruit. Using the BLAST program (Altschul et al., 1997), this cDNA was shown to be homologous to expansin *Cs-Exp1* of cucumber (*Cucumis sativus*) (Shcherban et al., 1995). This clone was therefore used to screen the cDNA library in order to get full length cDNA(s). Two different full-length cDNAs that strongly hybridized were isolated, checked to be homologous to expansin proteins (Altschul et al., 1997), and named *Pa-Exp1* (accession no. U93167) and *Pa-Exp2* (accession no. AF038815). *Pa-Exp1* and *Pa-Exp2* were 1,019 and 1,252 bp long, respectively. They contained 73 bp and 72 bp, respectively, of 5'-untranslated region. *Pa-Exp1* cDNA clone had an open reading frame of 765 bp encoding for 254

amino acids, and a 3'-untranslated region of 271 bp. *Pa-Exp2* cDNA clone had an open reading frame of 759 bp encoding for 252 amino acids, and a 3'-untranslated region of 421 bp.

### Analysis of the Amino Acid Sequences Deduced from the Isolated cDNAs

According to the SignalP program of Nielsen et al. (1997), *Pa-Exp1* and *Pa-Exp2* polypeptides presented a N-terminal signal sequence of 27 and 25 amino acids, respectively. The predicted *Pa-Exp1* and *Pa-Exp2* mature polypeptides presented a calculated molecular masses of approximately 24 kD, which is close to that of proteins previously purified from cucumber (McQueen-Mason et al., 1992), pea coleoptile (Li et al., 1993) and tomato leaves (Keller and Cosgrove, 1995). No motif for N-linked glycosylation was observed in predicted *Pa-Exp1* and *Pa-Exp2* polypeptides according to the PROSITE analysis (Hofmann et al., 1999). Both proteins were found extra-cellular-located according to the PSORT prediction program.

Two families of expansin protein,  $\alpha$ -expansin and  $\beta$ -expansin, are now recognized (Cosgrove et al., 1997; Cosgrove, 1998; 1999). Primary transcripts of the former are predicted to encode a pre-protein of ~27 kD, with a peptide signal of ~23 amino acids.  $\alpha$ -expansin typically lacked motifs for N-linked glycosylation. All these features were also observed in the predicted *Pa-Exp1* and *Pa-Exp2* polypeptides leading us to conclude that these two polypeptides belong to  $\alpha$ -expansin proteins. *Pa-Exp1* and *Pa-Exp2* showed each other 91.6% of identity at the amino acid level (mature proteins) and 67% of identity at nucleotide acid level.

The polypeptides predicted from *Pa-Exp1* and *Pa-Exp2* cDNAs were compared with other expansin proteins (Fig. 3). Considering the part of the polypeptides corresponding to the mature proteins, the identity scores found over the length of the other aligned sequences ranged from 74.0 to 87.2%, which is in accordance with the high level of expansin conservation in higher plants. This includes a series of highly conserved cysteine residues at N-terminal end, and tryptophan residues at C-terminal end that may work in binding cellulose or other glycans (Shcherban et al., 1995). The maximum identity score (Altschul et al., 1997) was observed with expansin of cucumber: *Cs-exp1* (Shcherban et al., 1995). Among the aligned sequences, the lowest identity scores were found with *Le-Exp5* (Brummel et al., 1999b) and *Le-Exp1* (Rose et al., 1997) (77.1 and 74.0% respectively), two cDNAs isolated from tomato fruit.

Since the 3'-untranslated regions of *Pa-Exp1* and *Pa-Exp2* were different enough, two cDNAs fragments, *Pa-Exp1-3'* and *Pa-Exp2-3'* were synthesized by polymerase chain reaction, as described above, within these regions. Both *Pa-Exp1-3'* and *Pa-Exp2-3'* included the polyA tails. They presented less than 40% identity and did not recognized each other as shown by DNA blot analysis (Fig. 4). The characterization of *Pa-Exp1-3'* and *Pa-Exp2-3'* confirmed them as usable as *Pa-Exp1* and *Pa-Exp2* specific probes.

### Southern-Blot Analysis

It is now assumed that expansins are encoded by a large multigene family. Two genes were found in cucumber (Shcherban et al., 1995), four in rice (Cho and Kende, 1997b), nine in tomato (Brummel et al., 1999b), six in tobacco (Link and Cosgrove, 1998) and twenty two in *Arabidopsis thaliana* (Cosgrove, 1999). The isolation of two different expansin cDNAs from apricot fruit is in agreement with these data. We further investigated whether more than two expansin genes are present in apricot fruit by using *Pa-*

*Exp1-3'* and *Pa-Exp2-3'* probes previously synthesized. Hybridization with *Pa-Exp1-3'* probe revealed a single band for DNA digested with *EcoR1*, *BamH1*, *HindIII*, and *Sac I* (Fig. 5A, lanes 1 to 4, respectively), at approximately 8.5, 22, 19 and 24 kb, respectively. When southern blot used to characterized *Pa-Exp1* is washed and re-probed with <sup>32</sup>P-labelled *Pa-Exp2-3'* (Fig. 5B), a single band was also revealed in each track, at approximately 11, 13, 4.5, and 18 kb, respectively. The Southern-blot analysis performed with a mixture of the labeled full-length *Pa-Exp1* and *Pa-Exp2* cDNAs (Fig. 5C) revealed the previous bands and several others additional bands. According to their restriction map, both *Pa-Exp1* and *Pa-Exp2* cDNAs do not contain the restriction sites of enzymes that we used in our experiment. Thus, the number and size of hybridized genomic fragments that we obtained allowed us to check and conclude that *Pa-Exp1* and *Pa-Exp2* are encoded by two different genes, and that each of them belongs to a multigene family in apricot genome.

### Northern-Blot Analysis: Expression of the *Pa-Exp1* and *Pa-Exp2* Genes during Apricot Ripening

Several studies on  $\alpha$ -expansin-gene expression have been recently published (Shcherban et al., 1995; Rose et al., 1997; Cho and Kende, 1997b; Orford and Timmis, 1998; Link and Cosgrove, 1998; Brummell et al., 1999b; Hutchison et al., 1999). Whatever the considered species, it appeared that expansin genes are differently expressed according to the tissue and stimuli, and are mainly associated with growth. At this date only *Le-Exp1* from tomato has been identified as a ripening- and ethylene-regulated expansin (Rose et al., 1997). Gene expression of *Pa-Exp1* and *Pa-Exp2* clones was tested by northern-blot analysis in fruit harvested at different ripening stages and in other plant organs (Fig. 6). In fruit tissues (Fig. 6A), a single 1.1-kb band was detected when hybridization was performed with *Pa-Exp1* specific probe. This transcript began to accumulate abundantly only at half-ripe stage (124 DAA) after the onset of fruit ripening but whereas cell enlargement has finished. In the latest ripening stages, at ripe (127 DAA) and over-ripe stages (131 DAA), the level of *Pa-Exp1* mRNA decreased. When the blot was hybridized with *Pa-Exp2* specific probe, a unique 1.2-kb RNA transcript was also detected. *Pa-Exp2* mRNA began to be detected at mature-green stage (103 DAA), at the beginning of fruit ripening. Its level increased substantially until the half-ripe (124 DAA) stage where it peaked. Then after the level of *Pa-Exp2* mRNA decreased throughout the ripe (127 DAA) and over-ripe stages (131 DAA).

No signal was detected in other plant organs including young leaves, flowers, roots, seeds and stems when *Pa-Exp1* and *Pa-Exp2* gene expression was analyzed by northern-blot analysis, even after a six-day exposure (data not showed). Thus, RT-PCR was performed with total RNA extracted from these organs to complete the study of *Pa-Exp1*- and *Pa-Exp2*-gene expression (Fig. 6B). Transcripts of both genes were detected in young leaves, flowers, and stems, all growing plant organs. Neither *Pa-Exp1* nor *Pa-Exp2* transcript was detected in mature seeds, a non-growing organ. Only *Pa-Exp1* was detected in roots. These results indicated that, although *Pa-Exp1* and *Pa-Exp2* may not be fruit specific, they are considerably more expressed in fruit than in other organs. Shieh and Cosgrove (1998) proposed that expansin genes encode for proteins with identical functions, but differ in their promoters and therefore in their pattern of expression. The fact that, in apricot, expression of expansin genes that we isolated, occurred in different manners in all growing tissues including fruits, young leaves, flowers, roots and stems, confirms this hypothesis.

### Northern-Blot Analysis: Expression of the *Pa-Exp1* and *Pa-Exp2* Genes after Treatment by High CO<sub>2</sub> Concentration

Our previous results indicated that, whatever the harvesting stage of fruit, a further six-day storage under high CO<sub>2</sub> concentration slowed down its development, including ethylene production and softening (Fig. 2). Expression of the *Pa-Exp1* and *Pa-Exp2* genes was followed in air- and CO<sub>2</sub>-treated fruits harvested at immature-green1, mature-green, breaker, half-ripe and ripe stages (Fig. 7).

Considering the air treatment, and by comparison with the control, there was a net increase in the amount of *Pa-Exp1* transcripts for fruits harvested at breaker stage. In contrary, fruits harvested at half-ripe stage showed their level of *Pa-Exp1* transcripts to decrease. At ripe stage of harvesting, there was no significant difference between air-treated fruits and the control.

For CO<sub>2</sub>-treated fruits, the level of *Pa-Exp1* transcripts was finally lower than that of control and lightly lower than that of air-treated fruits harvested at half-ripe and ripe stages.

Considering this time *Pa-Exp2*, we observed, for air-treated fruits, a net increase in the amount of *Pa-Exp2* transcripts for fruits harvested at breaker, half-ripe and ripe stages.

Contrarily, for CO<sub>2</sub>-treated fruits, the expression of *Pa-Exp2* was lower than that of air-treated fruits and was even lower than that of control.

Quantification of mRNA accumulation indicated that compared to mRNA levels in air-treated fruits, the levels of *Pa-Exp1* and *Pa-Exp2* mRNAs in CO<sub>2</sub>-treated fruits were reduced throughout the ripening stages by approximately 30 to 60%. Thus, high CO<sub>2</sub> concentration reduced the *Pa-Exp1*- and *Pa-Exp2*-gene expression as well as fruit development.

### Northern-Blot Analysis: Expression of the *Pa-Exp1* and *Pa-Exp2* Genes after Treatments by Ethylene and 1-MCP

Rose et al. (1997) demonstrated that *Le-Exp1*, encoding for one isoform of tomato expansin, is expressed specifically late in fruit development and is induced during ripening and by ethylene. We previously showed that in early-ripening stages, *Pa-Exp1* was not expressed and the time course of *Pa-Exp2* expression was similar to that of ethylene production, while in later ripening stages, both the *Pa-Exp1*- and *Pa-Exp2*-gene expressions were temporally negatively correlated with ethylene production. We attempted to investigate the putative relation between the *Pa-Exp1*- and *Pa-Exp2*-gene expression and ethylene. To this end, apricot fruits were harvested in 1998 at 106, 110, 113 and 115 DAA, treated by air, ethylene and 1-MCP as described in material and methods. These fruits were further used to analyze the *Pa-Exp1*- and *Pa-Exp2*-gene expression by northern-blot analysis (Fig. 8). Concerning the controls corresponding to fruit ripened on the tree, neither *Pa-Exp1* nor *Pa-Exp2* mRNAs were detected in fruits harvested 106 DAA. Then after, the level of transcripts of both genes peaked 113 DAA before to lightly decrease in fruits harvested 115 DAA. Although it appeared difficult to compare exactly the development of these fruits with those harvested in 1995, this result let us to consider fruits harvested 113 DAA to be approximately at half-ripe stage of development.

Considering first the air treatment, the amount of *Pa-Exp1* mRNAs lightly increased whatever the date of fruit harvesting by comparison with the control. Fruits harvested 106 DAA did not present ethylene emission after air treatment. Ethylene emission was maximum (26 nmol. kg<sup>-1</sup> of fresh weight.h<sup>-1</sup>) for fruits harvested 113 and 115 DAA. The level of *Pa-Exp1* expression did not present significant difference amongst fruits harvested 111, 113 or 115 DAA, although it was higher than for fruits harvested 106 DAA. Similar results were obtained for the *Pa-Exp2*-gene expression after treatment by air.

In matter of time course, results obtained after application of exogenous ethylene to fruit were identical than above as well as for *Pa-Exp1* and *Pa-Exp2* genes except than expression of both genes appeared to be reduced for fruits harvested 115 DAA. It is important to pick out that those fruits presented a very higher emission of ethylene ( $99 \text{ nmol. kg}^{-1}$  of fresh weight.h<sup>-1</sup>) than fruits harvested at other dates and than fruits ripened on tree. On another side, level of both *Pa-Exp1*- and *Pa-Exp2*-gene expression is comparable to that of air-treated fruits harvested 106, 111 and 113 DAA.

Under 1-MCP, and whatever their harvesting date, fruits produced less ethylene than under air or ethylene treatments. However, when compared to the air treatment, *Pa-Exp1* mRNA level was lightly lower for fruits harvested 111 and 113 DAA. In fruit harvested 115 DAA, the negative effect of 1-MCP on ethylene production is associated with a large increase of the *Pa-Exp1*-gene expression. When blot was washed and re-probed with <sup>32</sup>P-labelled *Pa-Exp2-3'*, no markedly difference was observed in fruits whatever their harvesting date. The expression of *Pa-Exp2* was also restored for fruits harvested 115 DAA.

### Conclusions

Fruit softening is known to be one of the ripening events that is the most sensitive to ethylene in climacteric fruits (Klee, 1993; Murray et al., 1993; Picton et al., 1993; Gerasopoulos and Richardson, 1996; Guis et al., 1997), and Rose et al. (1997) clearly identified *Le-Exp1* expansin as fruit- and ripening-specific and ethylene induced. Very recently, Brummell et al. (1999a) confirmed the role of *Le-Exp1*-expansin protein in tomato softening by antisens strategies.

In a first analysis, our results obtained on fruit ripened on tree let us to consider that ethylene might have an inducible effect on *Pa-Exp1* and *Pa-Exp2* genes. This putative effect is re-found after air-treatment but for *Pa-Exp1* only, and is not amplified by ethylene treatment nor decreased by 1-MCP treatments. Moreover, expression of both genes was increased in fruits harvested 106 DAA while there is no ethylene emission. Thus, the effect of ethylene remains unclear, and it seems likely that induction of the *Pa-Exp1*- and *Pa-Exp2*-gene expression that we observe might rather be associated with the general process of fruit development. On another side, since expression of both genes is inhibited when fruits present a high ethylene emission after ethylene treatment, and since 1-MCP, a well known inhibitor of ethylene action (Serek et al., 1994; 1995), restores the gene expression, we can hypothesize that the two expansin genes we have isolated, in particular *Pa-Exp1*, can be down-regulated by very high levels of ethylene. However again, fruits treated by ethylene and presenting an emission of  $57 \text{ nmol. kg}^{-1}$  of fresh weight.h<sup>-1</sup> did not see the expression of both genes reduced while fruits harvested after half-ripe stage on tree and having an emission of ethylene of only of  $44 \text{ nmol kg}^{-1}$  of fresh weight.h<sup>-1</sup>, did.

It is assumed that, in climacteric fruit, high CO<sub>2</sub> concentrations slow down the ripening process by inhibiting ethylene biosynthesis and action on ripening-related-gene expression (Burg and Burg, 1967; Sisler and Woo, 1988; Gorny and Kader, 1996; 1997; Rothan et al., 1997). The inhibiting effect of CO<sub>2</sub> observed on the expression of *Pa-Exp1* and *Pa-Exp2* may thus be linked to its alone effect on global ripening process.

Although it appears unlikely that *Pa-Exp1* and *Pa-Exp2* apricot-genes are induced by ethylene, they are clearly turned on during fruit ripening and are mainly expressed in fruit material. In that way, as we unable to detect specifically *Pa-Exp1*- and *Pa-Exp2*-expansin proteins by using, in western-blot analysis, antibodies raised against *Cs-Exp1* protein (data not showed), we have no idea about their amounts in the latest stages of apricot ripening. They may be not necessarily correlated with the amount of gene



transcripts and can stay at a high level even after the half-ripe stage of fruit development. This would confirm the role of expansin in softening.

Although apricot fruit is climacteric, there is, contrarily to tomato, superimposition of fruit growth and ripening. In this type of fruit, an hypothesis can be made that, may be, there is no specific ethylene-induced gene related to ripening. This hypothesis can be related to the recent results reported by Civello et al. (1999) on strawberry fruit, a non climacteric fruit, which has also superimposed growth and ripening, and in which the ripening-related *Fa-Exp2*-expansin gene is not affected by auxin treatment, contrarily to other strawberry ripening-regulated genes.

Nevertheless, we demonstrated that the two apricot cDNAs for expansin that we isolated belong to a multigene family. This also lets the possibility that a ripening and ethylene-dependent gene different from those we isolated in this study might also exist in apricot.

ACKNOWLEDGMENTS: The authors are grateful to Dr. D.J. Cosgrove for the generous gift of antibodies raised against *Cs-Exp1* protein

**Date of manuscript receipt:**

**Date of manuscript acceptance:**

#### LITERATURE CITED

- Abbal P, Planton, G** (1990) La mesure objective de la fermeté des fruits et légumes, un pénétromètre électronique automatique et programmable, le système Pénélaup. Infos ctilf (Informations du Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes) **62**: 27-30
- Ahmed AER, Labavitch, JM** (1980) Cell wall metabolism in ripening fruit I. cell wall changes in ripening "Bartlett" pears. *Plant Physiol* **65**: 1009-1113.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402
- Ben-Arie R, Kislev N, Frenkel C** (1979) Ultrastructure changes in the cell wall of ripening apple and pear fruit. *Plant Physiol* **64**: 197-202
- Bernatzky R, Tanksley SD** (1986). Genetics of actin-related sequences in tomato. *Theor Appl Genet* **72**: 314-321
- Bonghi C, Pagni S, Vidrih R, Ramina A, Tonutti P** (1996) Cell wall hydrolases and amylase in kiwifruit softening. *Postharvest Biol Technol* **9**: 19-29
- Brady CJ** (1987) Fruit ripening. *Annu Rev Plant Physiol* **38**: 155-178
- Brummell DA, Harpster MH, Civello PM, Palys JM, Bennett AB, Dunsmuir P** (1999a). Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *Plant Cell* **11**: 2203-2216
- Brummell DA, Harpster MH, Dunsmuir P** (1999b). Differential expression of expansin gene family members during growth and ripening of tomato fruit. *Plant Mol Biol* **39**: 161-169
- Burg SP, Burg EA** (1967) Molecular requirements for the biological activity of ethylene. *Plant Physiol* **42**: 144-152

- Chambroy Y, Souty M, Audergon JM, Jacquemin G, Gomez RM** (1995). Researches on the suitability of modified atmosphere packaging for shelf-life and quality improvement of apricot fruit. *Acta Hort* **384**: 633-638
- Chevallier T, De Rigal D, Mbégué-A-Mbégué D, Gaillard F, Forget-Richard F, Fils-Lycaon B** (1999) Molecular cloning and expression of a cDNA polyphenol oxidase isolated from apricot fruit (*Prunus armeniaca* cv. bergeron). *Plant Physiol* **119**: 1261-1269
- Cho HT, Kende H** (1997a) Expansins in deepwater rice internodes. *Plant Physiol* **113**: 1137-1143
- Cho HT, Kende H** (1997b) Expression of expansin genes is correlated with growth in deepwater rice. *Plant Cell* **9**: 1661-1671
- Civello PM, Powell ALT, Sabehat A, Bennett AB** (1999) An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit. *Plant Physiol* **121**: 1273-1279
- Corpet F** (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl Acids Res* **16**: 10881-10890
- Cosgrove DJ** (1996) Plant cell enlargement and the action of expansins. *Bio Assays* **18**: 533-540
- Cosgrove DJ** (1998) Cell wall loosening by expansins. *Plant Physiol* **118**: 333-339
- Cosgrove DJ** (1999) Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 391-417
- Cosgrove DJ, Bedibger PA, Durachko DM** (1997) Group I allergens of grass pollen as cell wall loosening agents. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 6559-6564
- Del Cura B, Escribano MI, Zamorano JP, Morodio C** (1996) High carbone dioxide delayed postharvested changes in RuBPCase and polygalacturonase-related protein in cherimoya peel. *J Amer Soc Hort Sci* **121**: 735-739
- Devereux J, Haeberli P, Smithies O** (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res* **12**: 387-395
- Fils-Lycaon B, Buret M** (1991) Changes in glycosidase activity during development and ripening of melon. *Postharvest Biol Technol* **1**: 143-151
- Fils-Lycaon BR, Wiersma PW, Eastwell K, Sautiere P** (1996) A cherry protein and its gene, abundantly expressed in ripening fruit, have been identified as thaumatin-like. *Plant Physiol* **111**: 269-273
- Fischer RL, Bennett AB** (1991) Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **42**: 675-703
- Frohman MA, Dush MK, Martin GR** (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts : Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci* **85**: 8998-9002
- Gallego PP, Zarra I** (1997) Changes in cell wall composition and Water-soluble polysaccharides during kiwifruit development. *Annals Bot* **79**: 695-701
- Gerasopoulos D, Richardson DG** (1996) Effects of exogenous propylene and fruit calcium on ripening of non-chilled and chilled Anjou pears. *Postharv Biol Technol* **8**: 111-120
- Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W** (1993) Fruits: a developmental perspective. *Plant Cell* **5**: 1439-1451
- Giovannoni JJ, DellaPenna D, Fischer R L, Bennett AB** (1989) Expression of a chimeric polygalacturonase gene in transgenic *rin* (ripening inhibitor) tomato fruit results in polyuronide degradation but not fruit softening. *Plant cell* **1**: 53-63

- Gorny JR, Kader AA** (1996) Controlled-atmosphere suppression of ACC synthase and ACC oxydase in “golden Delicious” apples during long-term cold storage. *J Amer Soc Hort Sci* **121**: 751-755
- Gorny JR, Kader AA** (1997) Low oxygen and elevated carbon dioxide atmospheres inhibit ethylene biosynthesis in preclimacteric and climacteric apple fruit. *J Amer Soc Hort Sci* **122**: 542-546
- Grierson D, Schuch W** (1993) Control of ripening. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London series B –biol Sci* **342**: 241-250
- Grierson D, Tucker GA** (1983) Timing of ethylene and polygalacturonase synthesis in relation to the control of tomato fruit. *Planta* **157**: 28-33
- Gross KC** (1984) Fractionation and partial characterization of cell walls from normal and non-ripening mutant tomato fruit. *Physiol Plant* **62**: 25-62
- Gross KC, Wallner SJ** (1979) Degradation of cell wall polysaccharides during tomato fruit ripening. *Plant Physiol* **63**: 117-120
- Guis M, Botondi R, Ben-amor M, Ayub R, Bouzayen M, Pech JC, Latché A** (1997) Ripening-associated biochemical traits of Cantaloupe Charentais melons expressing an antisens ACC oxidase transgene. *J Amer Soc Hort Sci* **122**: 748-751
- Hall LN, Tucker GA, Smith CJS, Watson CF, Seymour GB, Bundick Y, Boniwell JM, Fletcher JD, Ray JA, Schuch W, Bird CR, Grierson D** (1993) Antisens inhibition of pectin esterase gene expression in transgenic tomatoes. *Plant J* **3**: 121-129
- Hofmann K, Bucher P, Falquet L, Bairoch A** (1999) The PROSITE database. Its status in 1999. *Nucleic Acid Res* **27**: 215-219
- Huber DJ** (1983) Polyuronide degradation and hemicellulose modifications in ripening tomato fruit. *J Am Soc Hortic Sci* **108**: 405-409
- Hutchison KW, Singer PB, McInnis S, Diaz-Sala C, Greenwood MS** (1999) Expansins are conserved in conifers and expressed in hypocotyls in response to exogenous auxin. *Plant Physiol* **120**: 827-831
- Kader AA** (1986) Biochemical and physiological basis for effects of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables. *Food Technol* **40**: 99-104
- Keller E, Cosgrove DJ** (1995) Expansin in growing tomato leaves. *Plant J* **8**: 795-802
- Ketsa S, Daengkanit T** (1999) Firmness and activities of polygalacturonase, pectinesterase,  $\beta$ -galactosidase and cellulase in ripening during harvest at different stages of maturity. *Sci Hort* **80**: 181-188
- Klee HJ** (1993) Ripening physiology of fruit from transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants with reduced ethylene synthesis. *Plant Physiol*. **102**: 911-916
- Kubo Y, Inaba A, Nakamura R** (1990) Respiration and C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> production in various harvested crops held in CO<sub>2</sub>-enriched atmospheres. *J Amer Soc Hort Sci* **115**: 975-978
- Lashbrook CC, Giovannoni JJ, Hall BD, Fischer RL, Bennett AB** (1998) Transgenic analysis of tomato endo- $\beta$ -1,4-glucanase gene function. Role of *cell1* in floral abscission. *Plant J* **13**: 303-310
- Lazan H, Selamat MK, Ali ZM** (1995)  $\beta$ -galactosidase, polygalacturonase and pectinesterase in differential softening and cell wall modification during papaya fruit ripening. *Physiol Plant* **95**: 106-112
- Li ZC, Durachko DM, Cosgrove DJ** (1993) An oat coleoptile wall protein that induces wall extension in vitro and that is antigenically related to a similar protein from cucumber hypocotyls. *Planta* **191**: 349-356

- Link MB, Cosgrove DJ** (1998) Acid-growth response and a-expansin in suspension cultures of bright Yellow 2 tobacco. *Plant Physiol* **118**: 907-916
- Mbéguié-A-Mbéguié D, Chahine H, Gomez RM, Gouble B, Audergon JM, Souty M, Albagnac G, Fils-Lycaon B** (1999). Molecular cloning and expression of a cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase from apricot fruit (*Prunus armeniaca* cv. Bergeron). *Physiol Plant* **105**: 294-303
- Mbéguié-A-Mbéguié D, Gomez R-M, Fils-Lycaon B** (1997a) Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of a Rab7 Small GTP-Binding Protein from Apricot Fruit (Accession No. U82219). *Gene Expression During Fruit Ripening (PGR97-117)*. *Plant Physiol* **114**: 1569
- Mbéguié-A-Mbéguié D, Gomez R-M, Fils-Lycaon B** (1997b) Sequence of an O-Methyltransferase from Apricot Fruit (Accession No. U82011). *Gene Expression During Fruit Ripening (PGR97-118)*. *Plant Physiol* **114**: 1569
- Mbéguié-A-Mbéguié D, Gomez R-M, Fils-Lycaon B** (1997c) Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of a Metallothionein-like Protein From Apricot Fruit (Accession No. U97494). *Gene Expression During Fruit Ripening (PGR97-160)*. *Plant Physiol* **115**: 1288
- Mbéguié-A-Mbéguié D, Gomez R-M, Fils-Lycaon B** (1997d) Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of an Abscisic Acid-, Stress-, Ripening-Induced (ASR) -Like Protein From Apricot Fruit (Accession No. U93164). *Gene Expression During Fruit Ripening (PGR97-166)*. *Plant Physiol* **115**: 1288
- Mbéguié-A-Mbéguié D, Gomez RM, Fils-Lycaon B** (1997e) Sequence of AFTP1, a Cysteine Proteinase From Apricot Fruit (Accession No. U93166). *Gene Expression During Fruit Ripening (PGR97-179)*. *Plant Physiol* **115**: 1730
- McQueen-Mason S, Cosgrove DJ** (1994) Disruption of hydrogen bonding between plant cell polymers by proteins that induce wall extension. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 6574-6578
- McQueen-Mason S, Durachko DM, Cosgrove DJ** (1992) Two endogenous proteins that induced cell wall extension in plants. *Plant Cell* **4**: 1425-1433
- Murray AJ, Hobson GE, Schuch W, Burd C** (1993) Reduced ethylene synthesis in FE antisens tomato es has differential effect on fruit ripening process. *Postharvest Biol Technol* **2**: 301-314
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G** (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* **10**: 1-6
- Orford SJ, Timmis JN** (1998). Specific expression of an expansin gene during elongation of cotton fibers. *BBA-Gene Struc Expr* **1398**: 342-346
- Picton S, Barton SL, Bouzayen M, Hamilton AJ, Grierson D** (1993) Altered fruit ripening and leaf senescence in tomatoes expressing an antisens ethylene-forming enzyme transgene. *Plant J* **3**: 469-481
- Rothan C, Duret S, Chevalier C, Raymond P** (1997) Suppression of ripening-associated gene expression in tomato fruit subjected to a high CO<sub>2</sub> concentration. *Plant Physiol* **114**: 225-263
- Rothan C, Nicolas J** (1994) High CO<sub>2</sub> levels reduced ethylene production in kiwifruit. *Physiol Plant* **92**: 1-8
- Rose JKC, Bennett AB** (1999) Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. *Trends in Plant Sci* **5**: 176-183
- Rose JKC, Lee HH, Bennett AB** (1997) Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 5955-5960

- Sakurai N, Nevins DJ** (1997) Relationship between fruit softening and wall polysaccharides in avocado (*Persea americana* Mill) mesocarp tissues. *Plant cell Physiol* **38**: 603-610
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Ed 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Serek M, Sisler EC, Reid MS** (1994) Novel gaseous ethylene binding inhibitor prevents ethylene effects in potted flowering plant. *J Amer Soc Hort Sci* **119**: 1230-1233
- Serek M, Sisler EC, Reid MS** (1995) Effects of 1-MCP on the vase life and ethylene response of cut flowers. *Plant Growth Regul* **16**: 93-97
- Shcherban TY, Shi J, Durachko DM, Guiltinan MJ, McQueen-Mason S, Shieh M, Cosgrove DJ** (1995) Molecular cloning and sequence analysis of expansins a highly conserved, multigene family of proteins that mediate cell wall extension in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 9245-9249
- Sheehy RE, Kramer MK, Hiatt WR** (1988) Reduction of polygalacturonase activity in tomato fruit by antisense RNA. *Proc Natl Acad USA* **85**: 8805-8809
- Shieh MW, Cosgrove DJ** (1998) Expansins. *J Plant Res* **111**: 149-157
- Sisler EC, Woo C** (1988) Interaction of ethylene and CO<sub>2</sub>. *Physiol Plant* **73**: 440-444
- Smith CJS, Watson CF, Bird CR, Ray J, Schuch W, Grierson D** (1988) Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. *Nature* **334**: 724-726
- Tieman DM, Harriman RW, Ramamohan G, Handa AK** (1992) An antisense pectin methylesterase gene alters pectin chemistry and soluble solids in tomato fruit. *Plant Cell* **4**: 667-679
- Wang CY** (1990) Physiological and Biochemical effects of controlled atmospheres on fruits and vegetables. *In* M Calderon, R Barkai-Golan, eds, *Food preservation by modified atmospheres*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 197-223

## Plant Gene Register PGR97-118

**Didier Mbéguié-A-Mbéguié, Rose-Marie Gomez, and Bernard Fils-Lycaon** (1997) Sequence of an O-Methyltransferase from Apricot Fruit (Accession No. U82011). Gene Expression During Fruit Ripening (PGR97-118). *Plant Physiol.* **114**: 1569

### Sequence of an O-Methyltransferase from Apricot Fruit (Accession No. [U82011](#)). Gene Expression During Fruit Ripening

Didier Mbéguié-A-Mbéguié, Rose-Marie Gomez, and Bernard Fils-Lycaon  
INRA, Site Agroparc, Domaine Saint Paul, Station de Technologie des Produits Végétaux, 84914 AVIGNON cedex 9, FRANCE

Corresponding author: Bernard Fils-Lycaon

Fax: (33)-4-90-31-62-58

Email: lycaon@avignon.inra.fr

Footnotes: 1) OMT, O-methyltransferase; SAM, S-Adenosyl Methionine 2) This work was partly supported by a grant from the ministry of Education and Research of France.

Changes in protein expression have been well documented during the ripening of a variety of fruit species. However, at this date, a few is known about gene expression during ripening of apricot fruit. Such an investigation is in progress in our laboratory through the cloning of genes expressed at main stages of fruit development and the study of their differential expression during ripening time.

Here we report the sequence of a cDNA, pAPRI05, which has been isolated randomly from a cDNA library from ripe apricot fruit mRNA. The cloned sequence has a length of 1257 bp and encodes a 354 amino acid open reading frame. The encoded protein was shown to be a member of the O-methyltransferase family according to the NCBI BLAST e-mail server (National Library of Medicine, Bethesda, MD) using the Blast program (Altschul *et al.*, 1990). No OMT has been isolated yet from any fruit material. The highest homology scores founded over the entire length of aligned sequences were 64.9 % for the (+) 6a-hydroxymaackiain 3-OMT from *Pisum sativum* (Wu *et al.*, 1996), 60.5 % for the OMT from *Zea mays* (Held *et al.*, 1993), 60.4 % for the putative S-adenosyl-L-methionine methyl donor OMT from *Hordeum vulgare* leaves (Gregersen *et al.*, 1994) and 51.1 % for a multifunctional caffeic acid OMT from *Pinus taeda* (Li *et al.*, 1997) and *Pinus radiata* (Wagner *et al.*, 1996). The homology of the protein encoded by pAPRI05 with OMTs above appeared to be higher in the C-terminal half of the sequence, in particular, in the region from residue 195 to 354; which has already been observed for many methyltransferases of various sources (Gregersen *et al.*, 1994). It was thus 77.7 % and 61.1 % with the sequences from *Pisum sativum* and *Pinus taeda*, respectively.

Transmethylation of intermediary compounds plays an important role in the biosynthesis of secondary metabolites of plants and OMTs have been specially studied through their implication in response of plants to pathogens. Although, the enzyme encoded by pAPRI 05 clone presented its highest homologies with OMT involved in phytoalexin (Wu *et al.*, 1996), suberin (Held *et al.*, 1993), flavonoid (Gregersen *et al.*, 1994) and lignin (Li *et al.*, 1997) biosynthesis, we have no positive conclusive-information on its substrate specificity. The sequence did not contained the motif KELVDDISITN demonstrated as being involved in the binding of the methyl donor, SAM, for a rabbit protein carboxyl-OMT (Syed *et al.*, 1993). This leads to the conclusion that it is unlikely to be involved in DNA, RNA or protein methylation (Ingrosso *et al.*, 1989). Because of its cloning from mRNA extracted from healthy-, not wounded fruits, it is also unlikely to be involved in phytoalexin, lignin or suberin biosynthetic pathway. Involvement in flavonoid and isoflavonoid biosynthetic pathways may still be possible.

The expression of OMT from apricot fruit appeared to be regulated by gene expression, with mRNA levels increasing through the green into the light orange (half ripe) stage. The message levels appeared to decrease thereafter into the deep orange (full ripe) stage. Such a result was observed for two apricot species (Bergeron and Moniqui) very contrasted in regards to their ripening speed. For both apricot varieties, an high level of expression was observed at the light orange stage and no expression was observed in leaves, roots, seeds, flowers and stems which lead to presume this clone as fruit specific.

Apricot fruit is a climacteric fruit presenting, as all this sort of fruits, a ripening involving the regulated expression of specific genes under the control of the plant hormone ethylene (Grierson, 1987). We can conclude here that the OMT of apricot fruit was not ethylene-regulated since its expression occurred before the expression of ACC oxidase gene, a key enzyme in the ethylene biosynthesis, and before the ethylene production by fruit.

**Table 1.** Characteristics of clone pAPRI05

Organism:

*Prunus armeniaca* cv Bergeron

Source:

UNI-ZAP XR (Stratagene) cDNA library constructed using poly(A) mRNA purified from total RNA obtained according method of Fils-Lycaon *et al.* (1996)

Tissue type:

Ripe fruit (exocarp + mesocarp)

cDNA product:

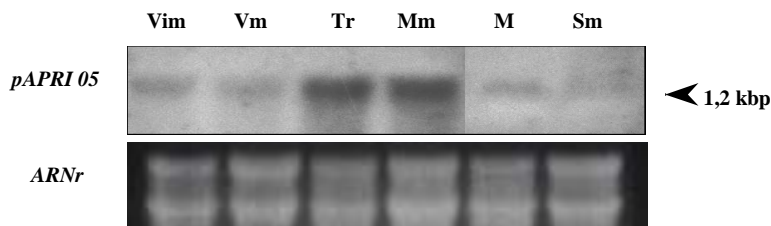
Encodes O-methyltransferase

Features of the cDNA:

cDNA contains 9 nucleotides of 5' untranslated region, an open reading frame of 1065 nucleotides and 183 nucleotides of the 3' untranslated region

Structural features of the deduced protein:

Gives a mature peptide of 354 amino acids with a calculated molecular mass of 39.38 kD and a pI of 5.42

**Figure:** Expression du clone *pAPRI 05* codant pour la O-méthyletransférase pendant la maturation du fruit d'abricot (Bergeron) et chez d'autres tissus de la plante.

Quinze µg d'ARN totaux pris à six stades de développement: IMG (vert immature), MG (vert mature), TR (tournant), Mm (mi-mûr), M (mûr), Sm (sur mûr) ont été utilisés. Le clone complet *pAPRI 05* marqué au  $\alpha$ -<sup>32</sup>PdCTP a été utilisé comme sonde et les membranes lavées à forte stringence. L'autographie a été exposée une nuit à -80°C.

## Literature cited

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410
- Fils-Lycaon BR, Wiersma PA, Eastwell KC, Sautiere P (1996) A cherry protein and its gene, abundantly expressed in ripening fruit, have been identified as thaumatin-like. *Plant Physiol* **111**: 269-273
- Gregersen L, Christensen AB, Sommer-Knudsen J, Collinge DB (1994) A putative O-methyltransferase from barley is induced by fungal pathogens and UV light. *Plant Mol Biol* **26**: 1797-1806
- Grierson D (1987) Senescence in fruits. *HortScience* **22**: 859-862
- Held BM, Wang H, John I, Wurtele ES, Colbert JT (1993) An mRNA putatively coding for an O-methyltransferase accumulates preferentially in maize roots and is located predominantly in the region of the endodermis. *Plant Physiol* **102**: 1001-1008
- Ingrassia D, Fowler AV, Bleibaum J, Clarke S (1989) Sequence of the D-aspartyl/L-isoaspartyl protein methyltransferase from human erythrocytes. *J Biol Chem* **264**: 20131-20139

- Li L, Popko JL, Zhang X-H, Osakabe K, Tsai C-J, Joshi CP, Chiang VL** (1997) A novel multifunctional O-methyltransferase implicated in a dual methylation pathway associated with lignin biosynthesis in loblolly pine. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 5461-5466
- Syed SK, Kim S, Paik WK** (1993) Identification of the S-adenosyl-L-methionine binding site of protein-carboxyl O-methyltransferase using 8-azido-S-adenosyl-L-methionine. *Biochemistry* **32**: 2242-2247
- Wagner A, Walden A, Narayan R, Walter C** (1996) *Pinus radiata* O-methyltransferase (omt) mRNA, complete cds. GenBank:[U70873](#)
- Wu Q, Preisig CL, VanEtten HD** (1996) Isolation of the gene encoding (+) 6a-hydroxymaackiain 3-O-methyltransferase, the terminal step for the synthesis of the phytoalexin in *Pisum sativum*. GenBank:[U69554](#)



## Plant Gene Register PGR97-160

**Didier Mbéguié-A-Mbéguié, Rose-Marie Gomez, and Bernard Fils-Lycaon** (1997) Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of a Metallothionein-like Protein From Apricot Fruit (Accession No. U97494). Gene Expression During Fruit Ripening. (PGR97-160). *Plant Physiol.* **115**: 1288

---

### Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of a Metallothionein-like Protein From Apricot Fruit (Accession No. [U97494](#)). Gene Expression During Fruit Ripening.

Didier Mbéguié-A-Mbéguié, Rose-Marie Gomez, and Bernard Fils-Lycaon (\*)

INRA, Site Agroparc, Domaine Saint Paul, Station de Technologie des Produits Végétaux, 84914 AVIGNON cedex 9, FRANCE

Corresponding author

E-mail [lycaon@avignon.inra.fr](mailto:lycaon@avignon.inra.fr)

Fax (33)-4-90-31-62-58.

Footnotes: This work was partly supported by a grant from the ministry of Education and Research of France.

Changes in gene expression have been well documented during the ripening of a variety of fruit species. However, at this date, a few is known about gene expression during ripening of apricot fruit. Such an investigation is in progress in our laboratory through the cloning of genes expressed at main stages of fruit development and the study of their differential expression during ripening time.

Here we report the sequence of a cDNA, pAPRI32, which has been isolated randomly from a cDNA library from ripe apricot fruit mRNA. The cloned sequence has a length of 691 bp and encodes a 80 amino acid open reading frame. The encoded protein was shown to be a Metallothionein-like protein according to the NCBI BLAST e-mail server (National Library of Medicine, Bethesda, MD) using the Blast program (Altschul *et al.*, 1990).

The highest homology scores founded over the entire length of aligned sequences were 86.2, 82.5, 81.2, 80.0 and 72.5 % for metallothionein-like proteins from apple fruit (Reid and Ross, 1996), kiwifruit (Ledger and Gardner, 1994), castor bean (Weig and Komor, 1995), soybean (Kawashima *et al.*, 1991) and strawberry fruit (Aguilar *et al.*, 1997), respectively.

Metallothioneins contains numerous cysteine residues required for their ability to detoxification of heavy metals by the binding of cations of transition metals (Kaegi, 1991). Primarily, they have been mainly isolated from animals but there is now a growing number of this type of protein described from plant species. According to their primary structure, metallothioneins are subdivided into three classes (Kaegi, 1991; Robinson *et al.*, 1993). Class I metallothioneins contain a number of cysteine residues clustered near the N- and C-terminus. These two clusters are separated by a central region of approximately 40 residues more or less conserved but without cysteine residue. Within this class, type 1 metallothioneins are characterized by several C-X-C motifs (where X is any amino acid except cysteine) within the N-terminal domain. In contrast, type 2 possess not only C-X-C motifs but also C-C and C-X-X-C motifs. Class II metallothioneins have cysteines that are not clustered. They form a more heterogeneous class. Metallothioneins of class III are non-gene encoded peptides of variable length with usually less than 20 atypical gamma-glutamyl-cysteinyl units. The apricot fruit metallothionein-like protein belongs to class I (type 2) metallothioneins. Between the specific C-C, C-X-C and C-X-X-C motifs from the N- and C-terminus, the protein sequence also contains 3 central motifs (MYPDIS, TTTETLIMGV, EMGV) highly conserved through several species.

Metallothioneins are known to be induced by hormones, second messengers, metals and stress conditions (Huang and Lin, 1989) in animals. Some of these effectors (Buchanan-Wollaston, 1994) and developmental events like germination (Weig and Komor, 1995) have also been demonstrated to induce plant metallothioneins. The pAPRI32 protein from apricot fruit appeared to be constitutively expressed whatever the fruit developmental stage. We also observed an high level of gene expression, which leads to presume the protein to be very abundant in fruit. Additionally, no expression was observed in young leaves, wounded leaves and stems. Contrarily to the metallothionein-like of strawberry fruit (Aguilar *et al.*, 1997), the metallothionein-like of apricot appears to not be ripening-related, neither ethylene-regulated since its expression occurred before the expression of ACC oxidase gene, a key enzyme in the ethylene biosynthesis, as before the ethylene production by fruit. Coming with ripening, the physiological event which is the dramatic increasing in fruit size may however play a role in such protein expression.

**Table 1.** Characteristics of clone pAPRI32

Organism:

*Prunus armeniaca* cv Bergeron

Source:

UNI-ZAP XR (Stratagene) cDNA library constructed using poly(A) mRNA purified from total RNA of ripe fruit

Tissue type:

Ripe fruit (exocarp + mesocarp)

cDNA product:

Encodes a metallothionein-like

Features of the cDNA:

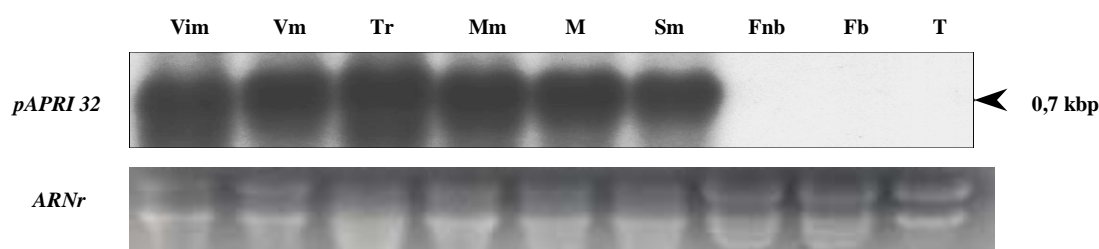
CDNA contains 58 nucleotides of 5' untranslated region, an open reading frame of 243 nucleotides and 390 nucleotides of the 3' untranslated region

Structural features of the deduced protein:

Gives a peptide of 80 amino acids with a calculated molecular mass of 7.96 kD and a pI of 4.95

Function of the protein:

Metallothioneins have a high content of cysteine residues that bind various heavy metals

**Figure:** Expression du clone *pAPRI 32* codant pour la Métallothionéine pendant la maturation du fruit d'abricot (Bergeron) et chez d'autres tissus de la plante.

Quinze  $\mu\text{g}$  d'ARN totaux pris à six stades de développement: IMG (vert immature), MG (vert mature), TR (tournant), Mm (mi-mûr), M (mûr), Sm (sur mûr), et autres tissus végétatifs: Fnb (feuille non blessée), Fb (feuilles blessées), T (tige) ont été utilisés.. Le clone complet *pAPRI 32* marqué au  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ dCTP a été utilisé comme sonde et les membranes lavées à forte stringence. L'autographie a été exposée une nuit à  $-80^\circ\text{C}$ .

### Literature Cited

- Aguilar M, Osuna D, Caballero JL, Munoz J** (1997) Isolation of a cDNA encoding a metallothionein-like protein (Accession No. U81041) from strawberry fruit ([PGR97-023](#)). *Plant Physiol* **113**: 664
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ** (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410
- Buchanan-Wollaston V** (1994) Isolation of cDNA clones that are expressed during leaf senescence in *Brassica napus*. *Plant Physiol* **105**: 839-846
- Huang PC, Lin LY** (1989) Metallothionein as a stress protein. In: Chiou CT, ed., *Biological active proteins and peptides*. Academia Sinica Press
- Kaegi JHR** (1991) Overview of metallothioneins. *Methods Enzymol* **205**: 613-626
- Kawashima I, Inokuchi Y, Chino M, Kimura M, Shimizu N** (1991) Isolation of a gene for a metallothionein-like protein from soybean. *Plant Cell Physiol* **32**: 913-916

- Ledger SE, Gardner RC** (1994) Cloning and characterization of five cDNAs for genes differentially expressed during development of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* var. *deliciosa*). *Plant Mol Biol* **25**(5): 877-886
- Reid SJ, Ross GS** (1996) Two cDNA clones encoding metallothionein-like proteins in apple are upregulated during cool storage. GenBank Accession No. [U61973](#)
- Robinson NJ, Tommey AM, Kuske C, Jackson PJ** (1993) Plant metallothioneins. *Biochem J* **295**: 1-10
- Weig A, Komor E** (1995) Isolation of a class II metallothionein cDNA (Accession No. L02306 from *Ricinus communis* L. ([PGR97-066](#))). *Plant Physiol* **109**: 721

## Plant Gene Register PGR97-166

**Didier Mbégué-A-Mbégué, Rose-Marie Gomez, and Bernard Fils-Lycaon**

Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of an Abscisic Acid-, Stress-, Ripening-Induced (ASR) -Like Protein From Apricot Fruit (Accession No. U93164). Gene Expression During Fruit Ripening. (PGR97-166). *Plant Physiol.* **115**: 1288

---

### **Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of an Abscisic Acid-, Stress-, Ripening-Induced (ASR) -Like Protein From Apricot Fruit (Accession No. [U93164](#)). Gene Expression During Fruit Ripening.**

Didier Mbégué-A-Mbégué, Rose-Marie Gomez, and Bernard Fils-Lycaon (\*)

INRA, Site Agroparc, Domaine Saint Paul, Station de Technologie des Produits Végétaux, 84914 AVIGNON cedex 9, FRANCE

Corresponding author;

E-mail: [lycaon@avignon.inra.fr](mailto:lycaon@avignon.inra.fr);

Fax (33)-4-90-31-62-58.

Footnotes: 1) ASR, abscisic acid-, stress-, ripening-inducible; 2) This work was partly supported by a grant from the ministry of Education and Research of France.

Changes in gene expression have been well documented during the ripening of a variety of fruit species. However, at this date, little is known about gene expression during ripening of apricot fruit. Such an investigation is in progress in our laboratory through the cloning of genes expressed at main stages of fruit development and the study of their differential expression during ripening time.

Here we report the sequence of a cDNA, pAPRI41, which has been isolated randomly from a cDNA library from ripe apricot fruit mRNA. The cloned sequence has a length of 976 bp and encodes a 200 amino acid open reading frame. The encoded protein was shown to be a member of the abscisic acid-, stress-, ripening-inducible protein (ASR) family according to the NCBI BLAST e-mail server (National Library of Medicine, Bethesda, MD) using the Blast program (Altschul *et al.*, 1990).

The highest homology scores founded over the entire length of aligned sequences were 47.5, 46.0, 42.5, 41.0, and 38.0 % for the ASRs from loblolly pine (Chang *et al.*, 1996), Chaco potato (DS2) (Silhavy *et al.*, 1995), tomato (Amitai-Zeigerson *et al.*, 1994 (ASR2); Iusem *et al.*, 1993 (ASR1)) and pummelo (Canel *et al.*, 1995). These low scores can be explained by an unconserved insert, from residue 19 to 112, between the conserved N- and C-terminus typical from ASRs. This insert is characterized by 4 repeated motifs composed of GY(5 or 6 G)YG suggesting these amino acids as structurally or functionally essential. Sequence from Chaco potato (Silhavy *et al.*, 1995) presents a similar display with GDDNK/TYGEKTSYG as repeated motif. The sequence from loblolly pine (Chang *et al.*, 1996) also presents an insert between the N- and C-terminus but it is free from repeated motif. The sequences from tomato and pummelo have no such insert. The homology of the protein encoded by pAPRI41 with ASRs above appeared to be higher in the C-terminal half of the sequence, and in particular, in the region from residue 113 to 200, with scores ranging from 81.6 to 87.3 %. Poly-Histidine and poly-Alanine domains, typical from ASR proteins, appear to be highly conserved in the apricot sequence. The two extended poly-Alanine domains AAAAGVFAL and EIAAAA AVGSGGFA are the two unique hydrophobic parts of the sequence and it may be assumed that they are important in regards of the function of the protein. As for DS2 protein from Chaco potato (Silhavy *et al.*, 1995), the rest of the pAPRI41 protein is highly hydrophylic with predicted random coil structure.

The expression of pAPRI41 protein from apricot fruit appeared to be regulated by gene expression, with mRNA levels lightly increasing through the immature-green stage into the light orange (half ripe) stage. The level of transcripts appeared to be constant then after until the deep orange (full ripe) stage. A high level of expression was observed from the mature green stage, which leads to presume the protein to be very abundant in fruit. Additionally, a very light expression was observed in leaves, wounded leaves, and stems.

Apricot fruit is a climacteric fruit presenting as all this sort of fruits, a ripening involving the regulated expression of specific genes under the control of the plant hormone ethylene (Grierson, 1987). We can conclude here that the Asr protein-like of apricot fruit was not ethylene-regulated since its expression occurred before the expression of ACC oxidase gene, a key enzyme in the ethylene biosynthesis, as before the ethylene production by fruit. It may however be ripening-related. The low level of expression in wounded leaves and the absence of increase in the level of transcripts by comparison to intact leaves let us to make it likely to not be wounded-regulated.

**Table 1.** Characteristics of clone pAPRI41

Organism:

*Prunus armeniaca* cv Bergeron

Source:

UNI-ZAP XR (Stratagene) cDNA library constructed using poly(A) mRNA purified from total RNA of ripe fruit obtained according to the method of Fils-Lycaon *et al.* (1996)

Tissue type:

Ripe fruit (exocarp + mesocarp)

cDNA product:

Encodes an Asr protein-like

Features of the cDNA:

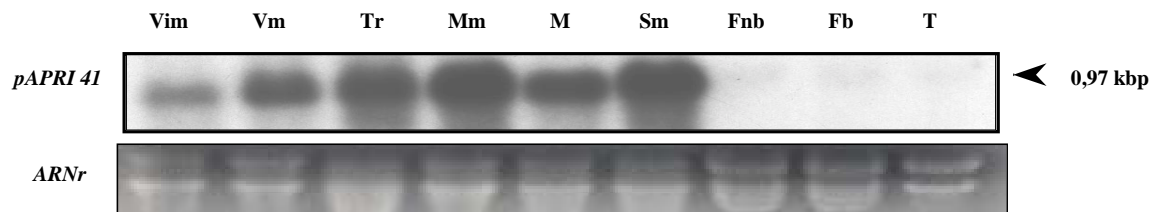
CDNA contains 172 nucleotides of 5' untranslated region, an open reading frame of 603 nucleotides and 201 nucleotides of the 3' untranslated region

Structural features of the deduced protein:

Gives a peptide of 200 amino acids with a calculated molecular mass of 21.24 kD and a pI of 6.03

Function of the protein:

unknown

**Figure:** Expression du clone *pAPRI 41* codant pour la protéine ASR pendant la maturation du fruit d'abricot (Bergeron) et chez d'autres tissus de la plante.

Quinze  $\mu\text{g}$  d'ARN totaux pris à six stades de développement: IMG (vert immature), MG (vert mature), TR (tournant), Mm (mi-mûr), M (mûr), Sm (sur mûr), et autres tissus végétatifs: Fnb (feuille non blessée), Fb (feuilles blessées), T (tige) ont été utilisés. Le clone complet pAPRI 41 marqué au  $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ dCTP a été utilisé comme sonde et les membranes lavées à forte stringence. L'autographie a été exposée une nuit à  $-80^\circ\text{C}$ .

**Literature cited**

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410
- Amitai-Zeigerson H, Scolnik PA, Bar-Zvi D (1994) Genomic nucleotide sequence of tomato Asr2, a second member of the stress/ripening-induced Asr1 gene family. *Plant Physiol* **106**(4): 1699-1700
- Canel C, Bailey-Serres JN, Roose ML (1995) Pummelo fruit transcript homologous to ripening-induced genes. *Plant Physiol* **108**(3): 1323-1325

- Chang S, Puryear JD, Dias MADL, Funkhouser EA, Newton RJ, Cairney J** (1996) Gene expression under water deficit in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): Isolation and characterization of cDNA clones. *Physiol Plant* **97**: 139-148
- Fils-Lycaon BR, Wiersma PA, Eastwell KC, Sautiere P** (1996) A cherry protein and its gene, abundantly expressed in ripening fruit, have been identified as thaumatin-like. *Plant Physiol* **111**: 269-273
- Grierson D** (1987) Senescence in fruits. *HortScience* **22**: 859-862
- Iusem ND, Bartholomew DM, Hitz WD, Scolnik PA** (1993) Tomato (*Lycopersicon esculentum*) transcript induced by water deficit and ripening. *Plant Physiol* **102(4)**: 1353-1354
- Silhavy D, Hutvagner G, Barta E, Banfalvi Z** (1995) Isolation and Characterization of a water-stress-inducible cDNA clone from *Solanum chacoense*. *Plant Mol Biol* **27**: 587-595

## Plant Gene Register PGR97-179

**Didier Mbéguié-A-Mbéguié, Rose-Marie Gomez, and Bernard Fils-Lycaon** (1997) Sequence of AFTP1, a Cysteine Proteinase From Apricot Fruit (Accession No. U93166). Gene Expression During Fruit Ripening. (PGR97-179). *Plant Physiol.* **115**: 1730

---

### Sequence of AFTP1, a Cysteine Proteinase From Apricot Fruit (Accession No. [U93166](#)). Gene Expression During Fruit Ripening.

Didier Mbéguié-A-Mbéguié, Rose-Marie Gomez, and Bernard Fils-Lycaon (\*)

INRA, Site Agroparc, Domaine Saint Paul, Station de Technologie des Produits Végétaux, 84914 AVIGNON cedex 9, FRANCE

Corresponding author;

E-mail:lycaon@avignon.inra.fr

FAX: (33)-4-90-31-62-58

Footnotes: This work was partly supported by a grant from the ministry of Education and Research of France.

Changes in gene expression have been well documented during the ripening of a variety of fruit species. However, at this date, little is known about gene expression during ripening of apricot fruit. Such an investigation is in progress in our laboratory through the cloning of genes expressed at main stages of fruit development and the study of their differential expression during ripening time.

Here we report the sequence of a cDNA, pAPRI52, which has been isolated randomly from a cDNA library from ripe apricot fruit mRNA. The cloned sequence has a length of 1444 bp and encodes a 358 amino acid open reading frame. The encoded protein was shown to be a cysteine proteinase according to the NCBI BLAST e-mail server (National Library of Medicine, Bethesda, MD) using the Blast program (Altschul *et al.*, 1997). It has been named AFTP1 (Apricot Fruit Thiol Proteinase 1).

The highest homology scores founded over the entire length of aligned sequences were 82.4, 81.3, and 79.9 % for the cysteine proteinases from pea (Jones *et al.*, 1996), petunia (Tournaire *et al.*, 1996) and tomato (Drake *et al.*, 1996), respectively. Thiol proteinases appear to be highly conserved through numerous plant species and present special characteristics. In the apricot case the initiation methionine codon was easily assigned because the following deduced amino acid sequence matches well with numerous other sequences and because the nucleotide sequence around it was consistent with the AACAAATGGC one proposed for plant mRNAs (Lütke *et al.*, 1987). The beginning of the sequence of AFTP1 is likely to correspond to a signal sequence in regards to the high hydrophobic level of the 24 first amino acid residues (Chrispeels, 1991) and the similarity with other thiol-proteinase signal sequences. The N-terminal part of AFTP1 also contains an SNPIR motif which is conserved in the 4 other proteinases mentioned above. This motif has been identified as a vacuolar sorting motif in plants (Holwerda *et al.*, 1992) and suggests the corresponding pAPRI52 protein to be located in the vacuole of fruit cells. Additionally, the site of post-translational cleavage (A/V-V/A-L-P) present in aleurain sequence (Holwerda *et al.*, 1990) and leading to the cleavage of the N-terminal 140-residues of the propeptide, is conserved in the AFTP1. The apricot protein is thus also likely to be matured as a shorter active peptide after being transported in the vacuole. Lastly, the sites of post-translational glycosylation, the amino acids Q(159), N(304), S(326), W(327), implicated in the structure of the protein active site, and the six Cys residues at positions 162, 196, 205, 238, 296, 346 involved in the disulfide bridges typical of thiol proteinases (Baker, 1980) are also conserved in AFTP1.

In plants, thiol proteinases have been mainly developmentally related to the mobilization of seed reserves through seed germination (Jones *et al.*, 1996), and to leaf senescence (Tournaire *et al.*, 1996). They have also been found to be expressed in roots and open mature flowers (Tournaire *et al.*, 1996). Additionally, SENU 2 cysteine proteinase from tomato fruit has been found to be induced as a response to extremes of temperature (Schaffer and Fisher, 1988). The expression of AFTP1 appeared to be regulated by gene expression, with mRNA transcripts absent at immature-green stage, present at mature-green stage, absent at the light yellow (turning) stage and finally accumulating through the light orange (half ripe) stage into the deep orange (full ripe) stage. At each time, a medium level of expression was observed, which leads to presume the protein to be abundant in fruit. Additionally, no expression was observed in young leaves, young wounded leaves and stems.

Apricot fruit is a climacteric fruit presenting as all this sort of fruits, a ripening involving the regulated expression of specific genes under the control of the plant hormone ethylene. We can conclude here that AFTP1 may be ethylene-, ripening-, senescence-regulated since its late expression occurred after the expression of ACC oxidase gene, a key enzyme in the ethylene biosynthesis, as during the ethylene production by fruit and its ripening and furthered senescence. The early expression of this gene at mature-green stage may result from a different inducing pathway linked to the drastic changes in metabolism and protein pattern occurring when the fruit tissues acquire their ability to respond to ethylene and ripe. However, on another hand, transition from immature-green to mature-green stages, as well as ripening and senescence may also be considered as

developmental stresses and may explain the gene expression as extremes of temperatures applied to tomato fruit (Schaffer and Fisher, 1988).

---

**Table 1.** Characteristics of clone pAPRI52

Organism:

*Prunus armeniaca* cv Bergeron

Source:

UNI-ZAP XR (Stratagene) cDNA library constructed using poly(A) mRNA purified from total RNA of ripe fruit

Tissue type:

Ripe fruit (exocarp + mesocarp)

cDNA product:

Encodes a thiol proteinase named AFTP1

Features of the cDNA:

CDNA contains 81 nucleotides of 5' untranslated region, an open reading frame of 1077 nucleotides and 286 nucleotides of the 3' untranslated region.

Structural features of the deduced protein:

Gives a propeptide of 358 amino acids with a calculated molecular mass of 39.31 kD and a pI of 6.82. By homology, may give a matured peptide of 218 amino acids with a calculated molecular mass of 23.55 kD and a pI of 4.81.

Function of the protein:

Hydrolysis of peptide bonds

---

#### Literature Cited

- Altschul, SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402
- Baker EN** (1980) Structure of actinidin after refinement at 1.7 Å resolution. *J Mol Biol* **141**: 441-484
- Chrispeels MJ** (1991) Sorting of proteins in the secretory system. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **42**: 21-53
- Drake R, John I, Farrell A, Cooper W, Schuch W, Grierson D** (1996) Isolation and analysis of cDNAs encoding tomato cysteine proteases expressed during leaf senescence. *Plant Mol Biol* **30(4)**: 755-767
- Holwerda BC, Galvin NJ, Baranski TJ, Rogers JC** (1990) In vitro processing of aleurain, a barley vacuolar thiol protease. *Plant cell* **2**: 1091-1106
- Holwerda BC, Padgett HS, Rogers JC** (1992) Proaleurain vacuolar targeting is mediated by short contiguous peptide interactions. *Plant cell* **4**: 307-318
- Jones, CG, Tucker GA, Lycett GW** (1996) Pattern of expression and characteristics of a cysteine proteinase cDNA from germinating seeds of pea (*Pisum sativum* L.) *Biochim Biophys Acta* **1296**: 13-15
- Lütke HA, Chow KC, Mickel FS, Moss KA, Kern HF, Scheele GA** (1987) Selection of AUG codons differs in plant and animals. *EMBO J* **6**: 43-48
- Schaffer MA, Fisher RL** (1988) Analysis of mRNAs that accumulate in response to low temperature identifies a thiol protease gene in tomato. *Plant Physiol* **87**: 431-436
- Tournaire C, Kushnir S, Bauw G, Inzé D, Teysseidier de la Serve B, Renaudin J-P** (1996) A thiol protease and an anionic peroxidase are induced by lowering cytokinins during callus growth in petunia. *Plant Physiol* **111**: 159-168



## Plant Gene Register PGR97-180

**Didier Mbégué-A-Mbégué, Rose-Marie Gomez, and Bernard Fils-Lycaon** (1997) Sequence of an Allergen-, Stress-, and Pathogenesis-related Protein From Apricot Fruit (Accession No. U93165). Gene Expression During Fruit Ripening. (PGR97-180). *Plant Physiol.* **115**: 1730

### Sequence of an Allergen-, Stress-, and Pathogenesis-related Protein From Apricot Fruit (Accession No. [U93165](#)). Gene Expression During Fruit Ripening.

Didier Mbégué-A-Mbégué, Rose-Marie Gomez, and Bernard Fils-Lycaon (\*)

INRA, Site Agroparc, Domaine Saint Paul, Station de Technologie des Produits Végétaux, 84914 AVIGNON cedex 9, FRANCE

Corresponding author;

E-mail: [lycaon@avignon.inra.fr](mailto:lycaon@avignon.inra.fr)

Fax: (33)-4-90-31-62-58

Footnotes: This work was partly supported by a grant from the ministry of Education and Research of France.

Changes in gene expression have been well documented during the ripening of a variety of fruit species. However, at this date, a few is known about gene expression during ripening of apricot fruit. Such an investigation is in progress in our laboratory through the cloning of genes expressed at main stages of fruit development and the study of their differential expression during ripening time.

Here we report the sequence of a cDNA, pAPRI35, which has been isolated randomly from a cDNA library from ripe apricot fruit mRNA. The cloned sequence has a length of 778 bp and encodes a 160 amino acid open reading frame. The encoded protein was shown to be a member of an allergen protein family according to the NCBI BLAST e-mail server (National Library of Medicine, Bethesda, MD) using the Blast program (Altschul *et al.*, 1990). Such proteins are also considered as stress-and pathogenegis-related proteins. They have mainly been isolated from leaves of different trees like apple (Vanek-Krebitz *et al.*, 1995), cherry (Scheurer *et al.*, 1996), hazel (Hoffmann-Sommergruber, 1996) and European white birch (Swoboda *et al.*, 1996) trees, and from European white birch pollen (Swoboda *et al.*, 1995). At this date only one form has been isolated from another fruit, namely apple fruit (Atkinson *et al.*, 1996). This type of protein appears to be very well conserved through species and the highest homology scores founded over the entire length of aligned sequences were 88.8, 87.5, 83.7, 81.2, 78.1 and 75.0 % for the major allergen proteins from apple mature leaf (Vanek-Krebitz *et al.*, 1995), sweet cherry leaf (Scheurer *et al.*, 1996), apple fruit (Atkinson *et al.*, 1996), hazel leaf (Hoffmann-Sommergruber, 1996), European white birch leaf (Swoboda *et al.*, 1996), and European white birch pollen (Swoboda *et al.*, 1995), respectively.

The expression of pAPRI35 protein from apricot fruit appeared to be regulated by gene expression, with mRNA levels increasing through the green into the light yellow-turning (beginning of ripening) stage. The message levels appeared to decrease during fruit ripening, after the light yellow-turning stage until the deep orange (full ripe) stage. A high level of expression was observed at the yellow-turning stage, which leads to presume the protein to be abundant in fruit. Additionally, a very light expression was observed in leaves and wounded leaves. No expression was observed in stems.

Apricot fruit is a climacteric fruit presenting as all this sort of fruits, a ripening involving the regulated expression of specific genes under the control of the plant hormone ethylene (Grierson, 1987). We can conclude here that the allergen protein of apricot fruit may be down-regulated by ethylene and ripening since its expression occurred before the expression of ACC oxidase gene, a key enzyme in the ethylene biosynthesis, and decreased with ripening and the appearance of the first transcripts of ACC oxidase. This possible down-regulation by ripening process is in contrast with the up-regulation of apple fruit allergen protein which appears to be ripening-related (Atkinson *et al.*, 1996)

**Table 1.** Characteristics of clone pAPRI35

Organism:

*Prunus armeniaca* cv Bergeron

Source:

UNI-ZAP XR (Stratagene) cDNA library constructed using poly(A) mRNA purified from total RNA of ripe fruit obtained according to the method of Fils-Lycaon *et al.* (1996)

Tissue type:

Ripe fruit (exocarp + mesocarp)

cDNA product:

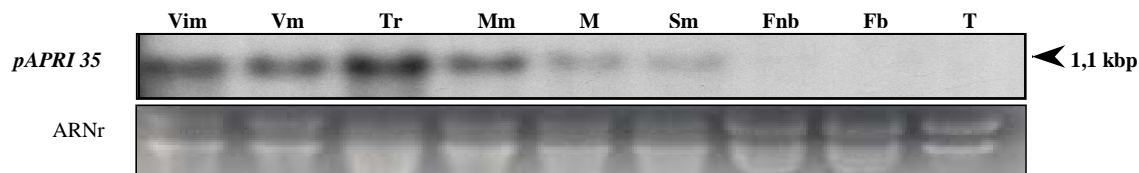
Encodes an allergen protein

Features of the cDNA:

cDNA contains 60 nucleotides of 5' untranslated region, an open reading frame of 483 nucleotides and 235 nucleotides of the 3' untranslated region

Structural features of the deduced protein:

Gives a peptide of 160 amino acids with a calculated molecular mass of 17.37 kD and a pI of 4.83



**Figure:** Expression du clone *pAPRI 35* codant pour la protéine Allergène pendant la maturation du fruit d'abricot (Bergeron) et chez d'autres tissus de la plante.

Quinze  $\mu$ g d'ARN totaux pris à six stades de développement: IMG (vert immature), MG (vert mature), TR (tournant), Mm (mi-mûr), M (mûr), Sm (sur mûr), et autres tissus végétatifs: Fnb (feuille non blessée), Fb (feuilles blessées), T (tige) ont été utilisés. Le clone complet *pAPRI 35* marqué au  $\alpha$ - $^{32}$ PdCTP a été utilisé comme sonde et les membranes lavées à forte stringence. L'autographie a été exposée une nuit à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## Literature Cited

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410
- Atkinson RG, Perry J, Matsui T, Ross GS, Macrae EA (1996) A stress-, pathogenesis-, and allergen-related cDNA in apple fruit is also ripening-related. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **24**: 103-107
- Fils-Lycaon BR, Wiersma PA, Eastwell KC, Sautiere P (1996) A cherry protein and its gene, abundantly expressed in ripening fruit, have been identified as thaumatin-like. *Plant Physiol* **111**: 269-273
- Grierson D (1987) Senescence in fruits. *HortScience* **22**: 859-862
- Hoffmann-Sommergruber K (1996) *C. avellana* gene for major allergen Cor a 1 (clone CAGC11). GenBank No. [Z72440](#)
- Scheurer S, Metzner K, Haustein D, Vieths S (1996) *Prunus avium* cherry-allergen PRUA1 mRNA, complete cds. GenBank No. [U66076](#)
- Swoboda I, Jilek A, Ferreira F, Engel E, Hoffmann-Sommergruber K, Scheiner O, Kraft D, Breiteneder H, Pittenauer E, Schmid E, Vicente O, Heberle-Bors E, Ahorn H, Breitenbach M (1995) Isoforms of Bet v 1, the major birch pollen allergen, analyzed by liquid chromatography, mass spectrometry, and cDNA cloning. *J Biol Chem* **270**(6): 2607-2613
- Swoboda I, Scheiner O, Heberle-Bors E, Vicente O (1996) Gene 1-Sc3 protein - European white birch. **PIR**: locus S47249
- Vanek-Krebitz M, Hoffmann-Sommergruber K, Laimer da Camara Machado M, Susani M, Ebner C, Kraft D, Scheiner O, Breiteneder H (1995) Cloning and sequencing of Mal d 1, the major allergen from apple (*Malus domestica*), and its immunological relationship to Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Biochem Biophys Res Commun* **214**(2): 538-551

## Plant Gene Register PGR2000-XXX

**Didier Mbéguié-A-Mbéguié and Bernard Fils-Lycaon** (2000) Molecular Cloning and Nucleotide Sequences of PA-ZE (Accession No. AF071888) and PA-ZE2 (Accession No. AF159948), Two cDNAs From Apricot Fruit Coding For a Zeaxanthin Epoxidase. Gene Expression During Fruit Ripening. (PGR2000-XXX). *Plant Physiol.* **114**: 1569.

---

Molecular Cloning and Nucleotide Sequences of PA-ZE (Accession No. [AF071888](#)) and PA-ZE2 (Accession No. [AF159948](#)), Two cDNAs From Apricot Fruit Coding For a Zeaxanthin Epoxidase. Gene Expression During Fruit Ripening.

Didier Mbéguié-A-Mbéguié and Bernard Fils-Lycaon\*

INRA, Site Agroparc, Domaine Saint Paul, Station de Technologie des Produits Vegetaux, 84914 AVIGNON cedex 9, FRANCE

\* Corresponding author; E-mail : [lycaon@antilles.inra.fr](mailto:lycaon@antilles.inra.fr) Fax 590-25-59-68.

Footnotes: This work was partly supported by a grant from the ministry of Education and Research of France.

Here we report the sequence of two cDNAs, PA-ZE and PA-ZE2, which have been isolated from a cDNA library from ripe apricot fruit mRNA. Their sequence analysis showed that they were identical within their 5'-untranslated region, coding sequence, and main part of their 3'-untranslated region where they however differed in length. The encoded protein was shown to be a zeaxanthin epoxidase (Altschul et al., 1997). The shortest clone (PA-ZE2) ended by a 14-(A)-long tail. The longest clone (PA-ZE) presented 46 extra (N)-bases after the first poly(A)-tail and exhibited a second 72-(A)-long poly(A)-tail.

Only three other zeaxanthin epoxidase sequences have been registered until now. They correspond to the proteins from tobacco (Marin et al., 1986), pepper (Bouvier et al., 1996), and tomato (Burbidge et al., 1997). The similarity scores shared by apricot zeaxanthin epoxidase with these proteins ranged from 78.2% to 82.4%.

The 54 first amino acids of the deduced protein are hydroxylated amino acid rich (20.4%), and thus, appear to be a putative plastid transit peptide (Gavel and Von Heijne, 1990) which may generate a mature protein of 66 kD, and is in agreement with the size for the zeaxanthin epoxidase mature proteins of pepper and tobacco.

The expression of the PA-ZE gene was examined in fruit during its development and in vegetative tissues. Northern-blot analysis revealed one major band at approximately 2.3 kb and a weaker and slightly shorter band, at approximately 2.2 kb; showing thus the presence of two transcripts of different sizes, contrarily to tomato, tobacco, and pepper. The two transcripts accumulated in the same manner in fruit although the level of the longest one appeared always higher than that of the shortest one. Their levels were significant in unripe fruit and increased gradually until mature-green stage where they peaked before to slightly decrease at breaker stage. At half-ripe stage, when fruit color became orange, the two transcripts accumulated abundantly. Their amounts finally decreased regularly as the fruit ripened. In seeds, both types of transcripts were slightly detected. In leaf, the longest transcript accumulated highly while the amount of the shortest transcript was very low. Both cDNAs were found in fruit as well in vegetative material, which leads to the conclusion that PA-ZE and PA-ZE2 may not be fruit specific.

The presence of two sorts of transcript differing by approximately 100 bp is in accordance with our results obtained from the screening of the cDNA library. Its minimizes the possible hypothesis that the isolation of two different cDNAs from the library would result from a cloning artefact. However, the presence of these two types of transcripts, so close, led us to question about their origins. The relative higher abundance of the longest transcript may let to think that it is the mature form of apricot ZE mRNA which is further translated to protein. The minor transcript could represent, i) a PA-ZE pre-messenger, ii) a transcript of a different gene but closely related to PA-ZE gene, iii) the product of degradation of the longest one.

Southern blot analysis indicated that zeaxanthin epoxidase gene is present in a single copy in apricot genome. This result is in agreement with that obtained by Marin et al (1996) in tobacco.

Previous work by Abler and Green (1996) reported the involvement of conserved Cis-acting elements at the 5'- and 3'-untranslated regions on mRNA stability. However, there is no nucleotide sequence in PA-ZE cDNA homologous to a highly conserved 3'-untranslated region known to be involved in plant and mammal mRNA stability. This point, added to our results let us to think that the two transcripts come from a unique gene and that the shortest one (PA-ZE2) is likely to be a degradation product of the longest one (PA-ZE); suggesting thus that PA-ZE mRNAs are unstable.

Ripening process of climacteric fruits, including apricot, is accompanied by a rise of ethylene production (Yang and Hoffman, 1984) and series of biochemical changes. The comportment of PA-ZE gene remains unclear in regards of ethylene: the accumulation of its mRNAs starts before the onset of ethylene production in green fruit, but the second peak of expression occurs after ethylene has been detected.

Demmig-Adams and Adams (1992) have reported that in photosynthetic higher plants tissues, a cyclic de-epoxidation of violaxanthin and epoxidation of zeaxanthin, occurred to protect tissues against high light

intensities. Our study shows that in unripe (green) fruit, PA-ZE transcripts accumulate as well as in photosynthetic tissues, while they do not in seed, a non photosynthetic organ. These results suggest a possible role of PA-ZE in such a xanthophyll cycle.

Rock and Zeevaart (1991) have also suggested the involvement of zeaxanthin epoxidase activity in ABA biosynthesis. The second increase in the amount of transcripts of zeaxanthin epoxidase occurring at half-ripe stage of fruit ripening may be connected with such a phenomenon since, in several climacteric and non-climacteric fruits, the amount of ABA is known to increase towards ripening process (Martinez-Madrid et al, 1996).

---

**Table 1.** Characteristics of clones PA-ZE and PA-ZE2

Organism:

Prunus armeniaca cv Bergeron

**Source:**

UNI-ZAP XR (Stratagene) cDNA library constructed using poly(A) mRNA purified from total RNA of ripe fruit

Tissue type:

Ripe fruit (exocarp + mesocarp)

cDNA products:

Encode a zeaxanthin epoxidase

**Length of the isolated cDNAs:**

PA-ZE = 2323 bp

PA-ZE2 = 2205 bp

Features of the cDNAs:

PA-ZE cDNA contains 73 nucleotides of 5'- untranslated region, an open reading frame of 1986 nucleotides and 264 nucleotides of the 3'- untranslated region. PA-ZE2 presents exactly the same features except the 3'- untranslated region which is 146 bp long.

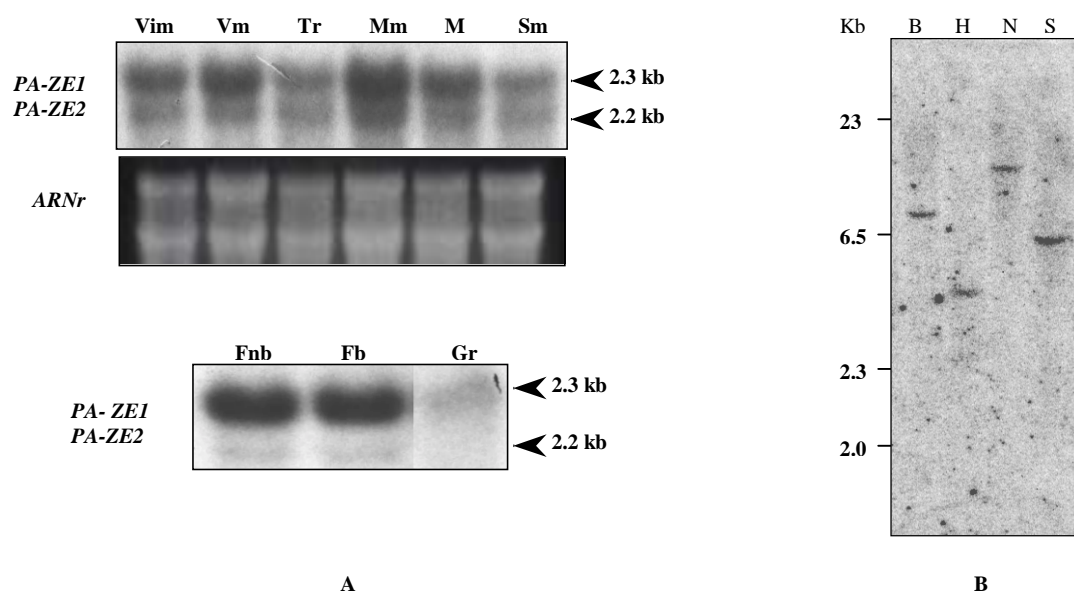
Structural features of the commune deduced protein:

Gives a putative pro-peptide of 661 amino acids with a calculated molecular mass of 72.5 kD and a pI of 7.2

By homology, may give a matured peptide of 607 amino acids with a calculated molecular mass of 66 kD

Function of the protein:

Epoxidation of zeaxanthin to violaxanthin



**Figure:** Expression des gènes de zeaxanthine époxydase pendant la maturation du fruit d'abricot (Bergeron) et chez d'autres tissus de la plante.

Le fragment du gène *PA-ZE* codant pour la partie conservée de la zéaxanthine époxydase (acides aminés 127-576) est marqué au  $\alpha$ - $^{32}$ PdCTP et utilisé comme sonde pour hybrider quinze µg d'ARN totaux (A) et l'ADN génomique (B) d'abricot. Quinze µg d'ARN totaux pris à six stades de développement: Vim (vert immature), Vm (vert mature), Tr (tournant), Mm (mi-mûr), M (mûr), Sm (sur mûr), et autres tissus végétatifs: Fnb (feuille non blessée), Fb (feuilles blessées), Gr (graine) ont été utilisés et l'ADN génomique digéré par *Bam*H (B), *Hind* III (H), *Nco*I (N) et *Sac*I (S).

#### Literature cited

- Abler ML, Green PJ** (1996) Control of mRNA stability in higher plants. *Plant Mol Biol* **32**: 63-78
- Altschul, SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402
- Bouvier F, d'Harlingue A, Hugueney P, Marin E, Marion-Poll A, Camara B** (1996) Xanthophyll Biosynthesis cloning, expression, functional reconstitution, and regulation of b-cyclohexenyl carotenoid epoxidase from pepper (*Capsicum annuum*). *J Biol Chem* **271**: 28861-28867
- Burbidge A, Grieve T, Terry C, Corlett J, Thompson A, Taylor I** (1997) *J Exp Bot* **48**: 1749-1750
- Demmig-Adams B, Adams III WW** (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **43**: 599-626
- Gavel Y, von Heijne G** (1990) A conserved cleavage-site motif in chloroplast transit peptides. *FEBS Lett* **261**: 455-458
- Marin E, Nussaume L, Queseda A, Gonneau M, Sotta B, Hugueney P, Frey A, Maron-Poll A** (1996) Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbatifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J* **15**: 2331-2342
- Martinez-Madrid MC, Serrano M, Riquelme F, Romojaro F** (1996) Polyamines, abscisic acid and ethylene production in tomato fruit. *Phytochemistry* **43**: 323-326
- Rock CD, Zeevaart JAD** (1991) The aba mutant of *Arabidopsis thaliana* is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7496-7499
- Yang SF, Hoffman NE** (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **35**: 155-189