MINISTERE DE L'AGRICULTURE

ECOLE NATIONALE SUPÉRIEURE AGRONOMIQUE DE MONTPELLIER

THÈSE

Présentée pour l'obtention du titre de

DOCTEUR EN SCIENCES

Spécialité: Génomique et Amélioration de Plantes

Ecole Doctorale: Biologie des Systèmes Intégrés Agronomie et Environnement Formation Doctorale: Ressources Phytogénétiques et Interactions Biologiques

par

BUSTAMANTE José

Titre de la thèse

Etude de quelques gènes codant pour les récepteurs d'éthylène chez les caféiers

Soutenue publiquement le 8 janvier 2007 devant le jury composé de,

M. CHARRIER André M. PECH Jean Claude

M. GRANELL Antonio

M. GRAZIOSI Giorgio M. de KOCHKO Alexandre Professeur à l'ENSA Montpellier Professeur à l'ENSA Toulouse Professeur Universidad Pol. Valencia Professeur University of Trieste DR IRD Montpellier Président Rapporteur Rapporteur Examinateur Directeur de thèse



A la mémoire de mon père Miguel Angel BUSTAMANTE C'est lui qui m'a transmit l'amour pour le caféier dans la ferme « Monte Claro » où j'ai passé mon enfance. Il m'a donné la force et le courage pour finir ce travail. Je suis sûr qu'il est avec DIEU et que de là-bas il nous aide et nous donne courage. Bendición papito

Remerciements

Essayer de nommer et remercier tous ceux qui m'ont aidé pendant mon travail de thèse est très difficile. Si j'écrivais une phrase pour chacun, cette partie serait plus longue que tout le manuscrite ; mais voilà :

- ➢ Je tiens tout d'abord à remercier M. Alexandre de KOCHKO pour m'avoir confié ce sujet de recherche passionnant et très important pour mieux comprendre la physiologie et la génétique moléculaire chez les caféiers. Merci pour sa générosité, son optimisme, son enthousiasme sincère, pour parler espagnol et pour comprendre ma rédaction en français avec ses hispanismes.
- ➤ Je remercie M. Serge Hamon pour m'avoir ouvert les portes de l'UMR DGPC. Bien sûr pour ses grands conseils et critiques pendant la rédaction et la préparation des articles.
- Un grand Merci à Mmes Claudine CAMPA et Perla HAMON pour leurs nombreux conseils. La correction du manuscrit a été un travail immesurable.
- > Un grand Merci à Valérie PONCET pour ses conseilles permanents et son aide inconditionnelle
- > Je remercie aux membres du comité de thèse : Mathilde CAUSSE, Frédéric GAYMARD et Farid REGAD pour ces conseils opportuns.
- ➤ Je remercie M. Patric ROUSSELLE, Karine et Marie-Claude de l'équipe de Génétique et amélioration des Fruits et des légumes de l'INRA Avignon pour leur générosité et tout l'immense travail de transformation de la tomate.
- Ma gratification aux membres de l'équipe « Génomique des Caféiers » : Nathalie CHABRILANGE, Stéphane DUSSERT, Thierry JOET, Pascale TALAMONT, Florent ENGELMANN et Michel NOIROT pour leurs contributions diverses.
- Je voudrais remercier Mme Claudine FRANCHE et Laurent LAPLAZE pour leurs conseils pendant les travaux de transgénèse et culture des Arabidopsis.



- Ma gratification aux filles de l'équipe de Résistance : Anne-Sophie PETITOT, Anne-Claire LECOULS, Marie-Christine COMBES et Diana FERNANDEZ pour leurs conseils permanents.
- ➤ Je suis reconnaissant à François ANTHONY, Benoît BERTRAND, Hervé ETIENNE, Christophe BRUGIDOU et Philippe LASHERMES pour tous leurs conseils bien appréciés.
- > Je voudrais bien remercier Benjamin PERET et Martine BANGRATZ pour tous ces conseils pratiques pendant la manip de transformation génétique.
- Un grand merci Mahesh VENKATARAMAIAH pour toute la formation en Biologie Moléculaire et Céline GOMEZ pour toutes ces conseils pendant la rédaction du manuscrite.
- Merci à touts les étudiants, stagiaires et à toutes les personnes que j'ai rencontrés en France et à l'IRD, particulièrement Edgardo, Juan Carlos, Diana, Leandro, Elijah, Shailendra, Laetitia, Eduardo, Romel, Giridar, Johann, Cristèle, les Miriam, les Aurèlie, Samsum, Carol, Freddy...
- Pour leur appréciable diligence, je voudrais aussi remercier Carolle BESSIERE et Bernard MARIN.
- ➢ Je tiens à remercier toute ma famille au Venezuela pour leur soutien moral, sa préoccupation et son appui constante. Spécialement à ma mère pour ses prières à Dieu pour nous ; mais aussi à mes frères et sœurs toujours inconditionnels, surtout à Teresa pour s'avoir occupé de tous nous affaires au Venezuela pendant notre séjour en France.
- Bien sûr, je dois remercier au FONACIT et INIA pour m'avoir donné la bourse pendant mon stage en France. Au M. Mme. le président, mais aussi tous les membres de la « Comisión de Educación » de l'INIA car toujours ils ont été prêtes pour nous aider.
- ➢ Je voudrais remercier infiniment à mes chefs de la maison pour lesquelles je donnerais ma vie. A ma femme Carmen Rosa, car elle est toujours à mon côté pour s'assurer que tout marche bien. Merci pour tes sacrifices et ton abnégation. A mes filles Rosa María y Mayra Alejandra pour les moments de bonheur qu'on a passé. Vous êtes le meilleur cadeau que DIEU nous a donné à votre mère et moi. Merci pour votre sacrifices quand nous avons quitté notre pays et d'avoir recommencé des études dans d'autre lange que nous ne comprenions pas.



LISTE DE TABLEAUX

Tableau 1.	Principaux caractères d'intérêt chez différentes espèces diploïdes de Coffea	22
Tableau 2.	Oligonucléotides synthétiques utilisés pour la RT-PCR semi quantitative	40
Tableau 3.	Effets d'ETR1 sur quelques caractères quantitatifs dans la descendance d'un back-cross interspécifique	49
Tableau 4.	Résultats de blastx sur GenBank obtenus avec les séquences présentes sur le clone BAC où se trouve le gène du récepteur d'éthylène CcEIN4	54
Tableau 5.	Croissance racinaire de plantes d'Arabidopsis transformése, avec les gènes CcETR1 ou CcEIN4 en orientation sens ou antisens sur milieu à salinité croissante	59

LISTE DE FIGURES

Figure 1	Mécanismes de régulation pendant le développement du fruit et rôle central de l'éthylène chez un fruit modèle de	4
F1 0	type climactérique comme la tomate	_
Figure 2	Voie de biosynthèse de l'éthylène	6
Figure 3	Model proposé de la régulation des gènes de la famille ACS pendant la transition du system 1 au system 2 durant la biosynthèse de l'éthylène chez la tomate.	7
Figure 4.	Transduction du signal éthylène	13
Figure 5	Différentes familles de récepteurs d'éthylène chez A. thaliana	14
Figure 6	Les récepteurs d'éthylène identifiés chez la tomate	16
Figure 7.	Phénotype présenté par de plantules étiolées d'Arabidopsis en absence ou en présence d'éthylène	17
Figure 8.	Quelques espèces de Coffea	18
Figure 9a	Cycle de fructification de C. arabica	19
Figure 9b.	Développement du fruit chez Coffea arabica	19
Figure 10.	Distribution géographique des groupes phylogénétiques des caféiers	20
Figure 11	Phylogénie des espèces basées sur l'ADN chloroplastique et l'ADN ribosomal	20
Figure 12.	Généalogie de la Variété INIA 01	25
Figure 13	Production d'éthylène pendant le développement et la maturation par les fruits de Coffea arabica	26
Figure 14.	Vecteur d'expression du gène CcETR1 en orientation sens et anti sens	42
Figure 15.	Vecteur d'expression du gène CcEIN4 en orientation sens et anti sens	42
Figure 16.	Vecteur d'expression du gène CcETR2 en orientation sens et anti sens	43
Figure 17.	Vecteur d'expression du gène CcERF1 en orientation sens	43
Figure 18.	Vecteur d'expression du gène CcERF2 en orientation sens	43
Figure 19.	Arbre phylogénétique construit sur la base de la diversité du 5 ^{ème} intron du gène ETR1	48
Figure 20.	Localisation du gène ETR1 sur la carte génétique établie avec la descendance du back-cross (CAN x HET) x CAN	50
Figure 21.	Localisation du gène ETR1 sur le groupe de liaison H de la carte génétique établie sur la descendance du back-cross (LIB x CAN) x CAN	50
Figure 22	Alignement des séquences en acides aminés de la région N-terminale des récepteurs d'éthylène du type EIN4 et ETR2	51



Figure 23.	Structure du gene EIN4 chez C. canephora en relation avec la structure de la protéine codée	51
Figure 24.	Localisation du gène EIN4 sur le groupe de liaison H de la carte génétique établie sur la descendance du back- cross (CAN x HET) x CAN	52
Figure 25.	Analyse de l'expression du gène EIN4 par PCR semi quantitative	53
Figure 26.	Séquence promotrice de CcEIN4	52
Figure 27.	Structure du gène ETR2 chez C. canephora	55
Figure 28.	Analyse de l'expression du gène ETR2 par PCR semi quantitative	56
Figure 29.	Analyse de l'expression du gène du facteur de transcription ERF2 par PCR semi quantitative	57
Figure 30	Groupe IX de la famille de gènes ERF d'Arabidopsis	58
Figure 31.	Alignement du domaine AP2/ERF de protéines putatives CcERF1, CcERF2 et leurs homologues d'Arabidopsis	58
Figure 32.	Séquence promotrice de CcERF1	58
Figure 33.	Croissance racinaire moyenne de différentes lignées d'Arabidopsis transformés avec CcETR1 ou CcEIN4 en orientation sens ou antisens	59
Figure 34.	Plants de tabac transgéniques transformés avec CcETR1 en orientation sens	59
Figure 35.	Expression de LeETR4 et LeETR5 dans les fruits, fleurs et tissus végétatifs chez la tomate.	65



TABLE DE MATIERES

RE	MERCIEMENTS	II
LIS	TE DE TABLEAUX	IV
LIS'	TE DE FIGURES	v
TAF	BLE DE MATIERES	VII
AVA	ANT-PROPOS	1
APE	ERÇU BIBLIOGRAPHIQUE	4
A)	L'éthylène	6
I)	Nature chimique et biosynthèse	6
II) L	a réponse à l'éthylène	10
	lodulation par d'autres voies métaboliqueslodulation de la réponse à l'éthylène par d'autres hormones	
171	Les auxines	
	Les gibbérellines	
	Les cytokinines	
	Le Jasmonate	11
Ľ,	'acide abscissique	
	Modulation par d'autres signaux	12
2) P	erception et transduction du signal éthylénique	13
	es Caféiers	
	iversité des caféiers.	
	tructure du génome des caféiers	
La	a sélection et l'amélioration des caféiers	
	Mise en cultureL'amélioration des caféiers	
	L'Hybridation chez C. arabica	
	L'Hybridation intra spécifique	
	L'Hybridation inter spécifique	
L'ét	hylène chez les caféiers	26
OB.	JECTIFS DE RECHERCHE	27
MA	TERIEL ET METHODES	29
Mate	ériel	29
M	latériel végétallatériel végétal	29
Le	es banques d'ADNc	30
La	a banque BAC	30



Méthodes	
Extraction et dosage de l'ADN total	30
Extraction et dosage de l'ARN	
Isolement des ADN complémentaires (ADNc) pleine longueur	31
1) Cas du gène ETR1	31
1-1 Dessin des amorces "consensus", et obtention de fragments amplifiés	
spécifiques (sondes)	31
1-2 Criblage de la banque d'ADNc	
2) Cas du gène CcEIN4	32
2-1 Dessin des amorces « consensus » et obtention des fragments amplifiés	
spécifiques (sondes)	32
2-2 Amplification de l'ADNc	
3) Cas du gène CcETR2	
3-1 Isolement d'une séquence partielle	
3-2. Construction d'une banque d'ADN génomique de Coffea canephora pou	r
l'approche de « marche sur le chromosome »	
3.2 Amplification de l'ADNc	
Etude de l'organisation des gènes	
Amplification des gènes pleine longueur	
Isolement de la région promotrice du gène CcEIN4	
Etude de la diversité génétique dans sept espèces de Coffea	33
Nombre de copies du gène CcETR1	30
Hybridation des membranes	30
Criblage de la banque BAC	
Préparation et marquage des sondes	
Etude de l'expression des gènes	
Isolement et analyse in silico des régions promotrices de CcEIN4 et de CcERF1	
Construction des vecteurs d'expression et transformation génétique	40 41
Transformation génétique	
Multiplication des vecteurs binaires	
Transformation d'Agrobacterium tumefaciens par électroporation	
Transformation d'Arabidopsis thaliana	
Transformation de Nicotiana tabacum	
DECLU TAT	40
RESULTAT	46
A. Etude du gène ETR1	47
	······ 4/
Isolement des séquences pleine longueur correspondant aux parties codantes des gènes	17
2) Etude de l'organisation de gène	47
Amplification du region 5' du gène ETR1	
3) Etude de la diversité génétique dans espèces du genre Coffea	
5) Litute de la diversite generique dans especes du genre conca	,то
B. Etude du gène EIN4	51
1) Organisation du gène	
2) Criblage de la banque BAC	
3) Etude de la diversité génétique chez quelques espèces du genre Coffea	
4) Etude de l'expression d'EIN4	
5) Etude de la séquence promotrice de CcEIN4	
6) Etude de quelques séquences voisines du gène CcEIN4	
, 1 1 1	
C. Etude du gène ETR2	55
1. Amplification de l'ADNc	55
2. Etude de l'organisation du gène	
3. Etude de l'expression de ETR2 chez CAN et PSE	



	tude du Facteur de Transcription CcERF2	56
1.	Clonage de l'ADNcEtude de l'expression d'ERF2 chez CAN et PSE	56
2.	Etude de l'expression d'ERF2 chez CAN et PSE	57
E. Et	ude du Facteur de Transcription ERF1	57
1.		
2.	Clonage du gène CcERF1 Etude de la séquence promotrice du CcERF1	58
F. Et	ude de transformants avec les gènes de récepteurs d'éthylène des caféiers	58
1.	Analyses de la sur-expression de CcETR1 et CcEIN4 chez A. thaliana	
2.	Analyses de la suppression de CcETR1 et CcEIN4 chez A. thaliana	59
3.	Analyses de la sur expression de CcETR1 chez N. tabacum	
DIC	CHCCION	60
DISC	CUSSION	00
A I.	e gène ETR1 chez les caféiers	60
1.		61
2.	Possible régulation post transcriptionelle d'ETR1 chez les caféiers	
R - I	e gène EIN4 chez les caféiers	64
1.		
2.	Le promoteur de CcEIN4 serait fleur et graine spécifique	
C I	e gène ETR2 chez les caféiers	66
1.	9	00
1.	pendant la maturation des grains de café	66
D I	es gènes de facteurs de Transcription de type AP2/ERF isolés chez les cafe	áiona 67
ט בי 1.		
1. 2.	CcERF2 est hautement exprimé pendant la maturation du fruit	
۷.	CCERF1, un gene mauit par des suess ?	08
E T	ransformation génétique	69
1.	Transformation avec les constructions géniques en orientation anti-sens	69
2.	Transformation avec les constructions géniques en orientation sens	70
3.	Surexpression des gènes de récepteur d'éthylène dans N. tabacum	71
PER	SPECTIVES	73
PUB	LICATIONS	75
Isola	tion and characterization of a Coffea canephora ERF-like cDNA	76
	cular Characterization of an Ethylene Receptor gene (CcETR1) in coffee tr	
relati	ionship with fruit development and caffeine content	80
BIRI	LIOGRAPHIE	114
ועוע	-1	1 1 🖚



AVANT-PROPOS

Le caféier est une plante cultivée économiquement très importante. Il représente le deuxième produit commercial après le pétrole et il est à la base de l'économie de beaucoup de pays tropicaux. Bien que le genre Coffea comprenne plus de 100 espèces, seules les espèces Coffea arabica et C. canephora sont économiquement importantes et représentent respectivement 68.6% et 31,4% de la production mondiale de café (International Coffee Organization: www.ico.org). Ces espèces possèdent des caractéristiques organoleptiques très différentes. La première, qui pousse principalement dans les régions d'altitude, est appréciée pour son arôme et sa faible teneur en caféine. La deuxième espèce produit une boisson plus amère avec une teneur en caféine plus élevée. Cette espèce est adaptée aux régions humides de basse altitude d'Afrique, d'Amérique Latine et d'Asie.

La qualité à la tasse du café est une propriété importante qui est liée à la teneur de la graine en divers composés biochimiques tels que la caféine, les acides chlorogéniques (CGA) (amertume), les sucres et les acides aminés (goût et arôme), la trigonelline et les matières grasses (arôme). La teneur en CGA chez les caféiers varie beaucoup entre les espèces du genre: entre 0,14% et 11,90% de matière sèche pour C. rhamnifolia Bridson et C. sp N'Koumbala respectivement (Clifford and Jarvis, 1988). La teneur en caféine varie aussi; l'espèce C. pseudozanguebariae a la plus faible valeur, proche de 0 (Hamon et al., 1984). La teneur de la graine en métabolites, primaires et secondaires, est dépendante de différents processus physiologiques, souvent soumis à la régulation génétique et dont les plus importants sont la biosynthèse, le transport et l'accumulation de ces composés. Selon les espèces, la durée de formation du fruit, ou cycle de fructification, peut être plus ou moins long et peut ainsi conduire à des teneurs finales plus importantes en certains métabolites. Dans le cas de C. pseudozanguebariae, pour lequel la teneur en caféine des grains verts est très faible, le cycle de fructification est très court (2,5 mois) comparé aux deux espèces cultivées pour lesquelles les cycles de fructification varient de 8 à 10 mois. Or, chez ces deux espèces, les teneurs en caféine sont plus importantes, allant de 1,2% pour C. arabica jusqu'à 3,3% pour C. canephora.



Dans l'équipe IRD « Génomique et qualité des caféiers » de l'UMR Diversité et adaptation des plantes cultivées, différentes populations issues de croisements inter-spécifiques de caféiers sont étudiées afin de mieux comprendre leurs relations génétiques et leurs différences phénotypiques. Lors de ces études, un gène majeur en relation avec la durée de fructification a été positionné sur la carte génétique issue du croissement [(C. pseudozanguebariae x C. dewevrei) x C. pseudozanguebariae] (Akaffou et al., 2003) et il a été montré que ce gène a des effets sur la teneur en caféine. Par ailleurs, la co-localisation d'un gène récepteur de l'éthylène et d'un QTL en relation avec la caractéristique climactérique du fruit du melon a été publiée (Perin et al., 2002). L'ensemble de ces éléments conduit à penser que les récepteurs de l'éthylène pourraient être en relation avec d'autres processus métaboliques impliqués dans la physiologie des fruits des caféiers.

A ce jour, très peu d'informations sont disponibles sur le mécanisme de réponse des fruits de caféier à l'éthylène, même s'il a été montré que ces fruits sont de type climactérique, ils présentent un pic de respiration et de synthèse d'éthylène au moment de la maturation (Pereira et al., 2005). Dans le cadre de cette étude nous nous proposons d'étudier certains gènes récepteurs d'éthylène chez quelques espèces particulières de Coffea. J'ai ainsi isolé trois gènes ; j'ai réalisé leur caractérisation moléculaire, l'étude de leur expression ainsi que de leur localisation sur des cartes génétiques disponibles, en cherchant plus particulièrement à mettre en évidence leur possible implication dans le cycle de fructification et les teneurs de la graine en composés biochimiques importants pour la qualité du café boisson. Cette étude a été réalisée dans un premier temps chez des espèces diploïdes. Ces gènes ont été isolés et caractérisés chez l'espèce cultivée Coffea canephora (CAN), mais aussi chez des espèces sauvages retenues pour leurs caractéristiques particulières. Ainsi, les espèces C. dewevrei (DEW) et C. pseudozanguebariae (PSE) ont été choisies pour leurs caractéristiques contrastées en termes de cycle de fructification, de teneur en caféine des graines et de synchronisation dans la maturation; C. heterocalyx (HET) l'une des rares espèces diploïdes auto compatibles a été choisie sur ce critère. Cette particularité se retrouve chez C. sp Moloundou (MOL). Alors que tous les autres caféiers diploïdes sont autoincompatibles.



J'ai recherché les gènes codant pour des récepteurs de l'éthylène, qu'ils soient exprimés dans les fruits ou dans les feuilles de CAN. Pour cette étude, une méthodologie classique a été suivie (extraction d'acides nucléiques, clonage, criblage de banques d'ADNc...). Elle m'a permis de révéler la séquence des gènes ainsi que leur structure (parties introniqes et exoniques), le criblage d'une banque BAC m'a permis d'isoler la séquence promotrice d'un de ces gènes dont l'étude de la régulation a été faite in silico.

En utilisant la diversité interspécifique de ces gènes, leur localisation sur des cartes génétiques a été faite par étude de leur ségrégation dans des différentes populations dérivées de croisements inter-spécifiques.

Enfin, les effets de la sur-expression et de la suppression de l'expression de ces gènes de récepteurs d'éthylène ont été étudiés chez des transformants d'Arabidopsis thaliana, mais aussi chez le tabac (Nicotiana tabacum).

Cette thèse représente la première étude des récepteurs d'éthylène chez les caféiers. En utilisant une approche intégrative du problème faisant appel à des techniques multidisciplinaires comme la Biologie Moléculaire, la Physiologie, la Génétique Mendélienne et l'Agronomie. J'ai pu élaborer des modèles quant à la régulation et l'implication des récepteurs d'éthylène dans l'expression de caractères agromorphologiques, biochimiques et physiologiques.



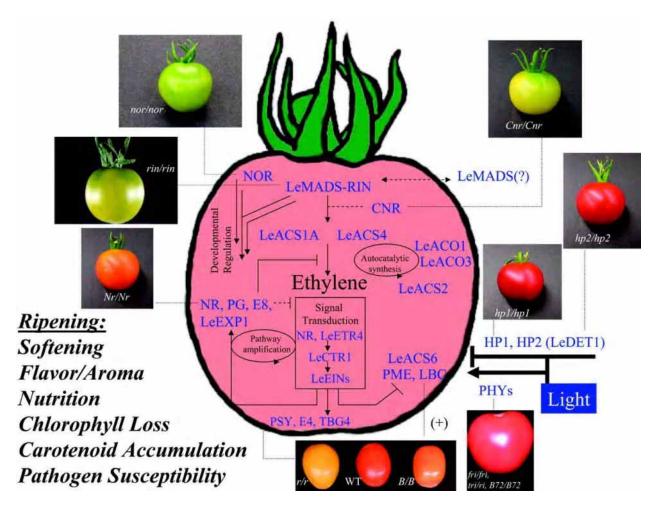


Figure 1. Mécanismes de régulation pendant le développement du fruit et rôle central de l'éthylène chez un fruit modèle de type climactérique comme la tomate (d'après Giovannoni, 2004)



APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE

La maturation des fruits est un phénomène physiologique complexe, génétiquement programmé, caractérisé par des changements profonds dans la couleur, la texture, la saveur, l'arôme, la teneur en composés biochimiques, etc. Les fruits, selon leur mode de maturation, sont classés en deux groupes : 1.) Les fruits de type climactérique, dont la maturation est accompagnée d'un pic respiratoire et d'une brusque production d'éthylène, et 2.) Les fruits de type non climactérique, dont la respiration ne montre pas de changement remarquable et dont la production d'éthylène est faible et stable. Il a été démontré que la présence d'éthylène affecte la transcription et la traduction de nombreux gènes impliqués dans la croissance et la maturation des fruits. Dans la figure 1, nous pouvons observer le mécanisme complexe de régulation pendant le développement du fruit et le rôle central de l'éthylène à cette étape chez une plante modèle de type climactérique comme la tomate (Giovannoni, 2004).

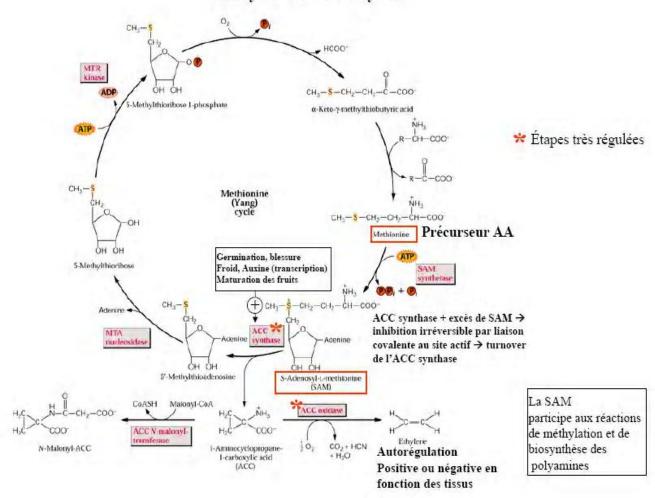
L'éthylène est aussi une hormone responsable d'un très grand nombre d'effets chez les plantes supérieures comme la sénescence et l'abscission (Abeles et al., 1992). L'éthylène est également impliqué dans les processus de développement de la plante, comme la formation de la coiffe apicale chez les plantes étiolées à l'obscurité (cette coiffe protège le méristème apical quand les jeunes plantules forcent leur voie à travers le sol vers la lumière), la régulation de l'expansion cellulaire ou le développement de la fleur. Cette hormone régule également la réponse de la plante aux stress biotiques induits par les pathogènes, mais aussi par les stress abiotiques, tels que la sécheresse ou les inondations (Abeles et al., 1992; Roman et al., 1995; O'Donnell et al., 1996; Penninckx et al., 1998; O'Donnell et al., 2003). Il existe des interférences entre la signalisation de l'éthylène et d'autres signaux comme ceux de l'auxine, dont les effets sont fréquemment régulés par l'éthylène. D'autres interférences existent aussi et impliquent l'acide abscissique, les gibbérellines, les cytokinines, ou encore d'autres agents transducteurs de signal.

Les fruits de caféiers sont des fruits climactériques, chez lesquels il paraît intéressant d'étudier les modes de perception et de transduction du



signal éthylénique. De plus, les caféiers, regroupés dans le genre Coffea, constituent un grand complexe d'espèces. Le genre est formé de plus de 100 espèces présentant une très forte diversité sur les plans morphologiques, physiologiques et génétiques. Ainsi, les fortes différences interspécifiques observées dans les durées de fructification et dans l'accumulation de composés biochimiques dans les grains, laissent penser que ces ligneux peuvent constituer un outil de choix pour étudier le rôle de l'éthylène dans le cycle de fructification.

Biosynthèse de l'éthylène



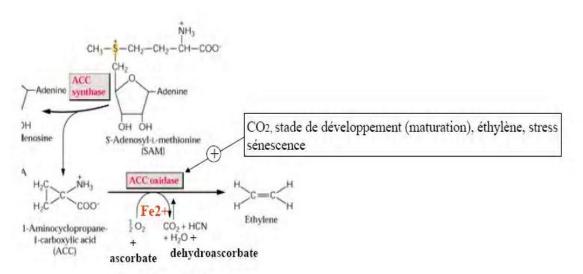


Figure 2. Voie de biosynthèse de l'éthylène



A) L'éthylène

I) Nature chimique et biosynthèse

L'éthylène (C₂H₄) est un gaz dont on a depuis longtemps établi empiriquement les effets sur le mûrissement des fruits. Dès les années 1925-1930, de nombreuses observations montraient le pouvoir de ce gaz sur la levée de dormance (sur les yeux de pomme de terre), sur la floraison (ananas), sur la chute des feuilles. Dès 1933, Gane démontrait que les fruits mûrissant pouvaient émettre de l'éthylène, mais la nature chimique simple de l'éthylène faisait penser que ce gaz n'était qu'un produit de dégradation sans intérêt physiologique. Dans les années 70, la reprise de travaux scientifiques a permis de montrer que l'éthylène avait un rôle important dans le développement et pouvait être considéré comme une hormone végétale (Abeles et al., 1992).

Sa synthèse débute à partir du S-adénosyl-L-Méthionine (SAdoMet) (figure 2). Ce produit est transformé en 1-aminocyclopropane-1-acide carboxylique (ACC) par l'enzyme ACC synthase (ACS), puis en éthylène par l'ACC oxydase (ACO). La synthèse de l'éthylène peut être induite par différents facteurs, qu'ils soient liés au développement (germination, croissance, maturation, sénescence), aux stress biotiques (phytopathogènes, insectes) ou abiotiques (blessure, ozone, lumière ultra violette, etc.), ou encore à un traitement exogène (cytokinine, auxine).

L'étape limitante de la synthèse d'éthylène est constituée par la conversion du SAdoMet en ACC par l'ACC synthase (Kende, 1993). Les observations montrent que cette ACS est codée par une famille multigénique et que l'expression des gènes d'ACS est fortement régulée par une grande variété de signaux. L'étude du mécanisme de régulation de la biosynthèse de l'éthylène a permis de dégager deux niveaux de régulation majeurs : le rétrocontrôle positif ou négatif (Kende, 1993; Nakatsuka et al., 1998; Barry et al., 2000). Ainsi, chez la tomate, il existe au moins huit gènes ACS qui ont été identifiés (dont LeACS1A, LeACS1B et LeACS2-7) (Zarembinski et Theologis, 1994; Oetiker et al., 1997; Nakatsuka et al., 1998; Shiu et al., 1998). Pendant la maturation des fruits, au moins quatre gènes ACS sont exprimés (Rottmann et al., 1991; Barry et al., 2000). LeACS6 est responsable de la production d'éthylène durant l'étape de pré maturation et son expression est inhibée par



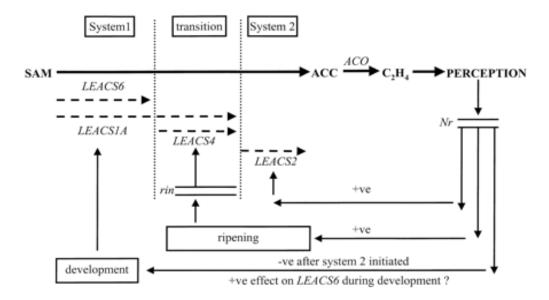


Figure 3. Modèle proposé de la régulation des gènes de la famille ACS pendant la transition du system 1 au system 2 durant la biosynthèse de l'éthylène chez la tomate. (d'après Barry et al., 2000)



la production d'éthylène au cours de la maturation du fruit. LeACS4 est responsable de la production d'éthylène à l'initiation de la maturation des fruits, c'est-à-dire, pendant la période de transition de la maturation. Ce gène, ainsi que LeACS2 sont, par contre, positivement contrôlés par l'éthylène synthétisé lors de la maturation du fruit.

Cette régulation complexe par l'éthylène chez les fruits climactériques pourrait être sous la dépendance de critères développementaux. A ce propos , Yang, (1987) puis Lelievre et al., (1997) propose deux systèmes probables pour la synthèse de l'éthylène. Cette terminologie fait référence au profil de synthèse de l'éthylène dans des fruits non mûrs par opposition à la synthèse de l'éthylène dans des fruits mûrs.

Chez les fruits immatures, la production d'éthylène est très faible et un traitement avec de l'éthylène exogène ne stimule pas la production d'éthylène endogène (système 1). Par contre, pendant la maturation des fruits, l'éthylène est produit de manière auto-catalytique, stimulant la production d'éthylène supplémentaire (système 2). La différence entre les deux systèmes peut être expliquée au niveau moléculaire par le manque d'induction de la transcription de l'ACC synthase, laquelle est réprimée dans le système 1 alors qu'elle est induite dans le système 2. Ainsi, les fruits non mûrs reconnaissent et répondent à l'éthylène, comme indiqué par l'expression accrue de certains gènes « éthylène inductibles ». Cependant, l'éthylène n'initie pas la maturation des fruits verts. Ce n'est qu'à un stade de « brake1» que les fruits mûrs vont répondre à l'éthylène par l'induction d'un grand nombre de gènes associés à la maturation. L'ensemble de ces faits tend à prouver qu'il existe une composante développementale à la régulation par l'éthylène, ce qui a conduit Barry et al. (2000) à actualiser le modèle de régulation de l'ACS pendant le développement du fruit de la tomate (figure 3).

Chez la tomate, la mutation rin, produit des fruits ayant une maturation sévèrement réduite. Une propriété de ces fruits est qu'il n'y a pas de production accrue de l'éthylène associée au système 2, ce qui est normalement une caractéristique des fruits de type climactérique. Dans ces fruits, la faible production d'éthylène pendant le système 1 est maintenue pendant le système 2, à un niveau similaire à celui observé lors du



 $^{^{\}rm 1}$ Moment de changement de stade dans le fruit, de vert à rouge

développement du fruit vert de type sauvage (Lincoln and Fischer, 1988). Le locus rin code pour un facteur de transcription de type « MADS box ». Le phénotype mutant se traduit par le contrôle de la maturation en terme de contrôle de la production de l'éthylène climactérique (vraisemblablement par le contrôle de LeACS1A et LeACS4), en association avec d'autres processus de régulation, en dehors de l'influence de l'éthylène (Vrebalov et al., 2002).

Chez A. thaliana, la transcription des gènes de la famille ACS est différemment régulée pendant le développement de la plante, en fonction des tissus et en réponse à divers stimuli tels que l'ozone et les anaérobioses (Liang et al., 1992; Vahala et al., 1998). Dans cette espèce, 12 gènes d'ACS ont été caractérisés (Liang et al., 1992; Van Der Straeten et al., 1992; Arteca et Arteca, 1999; Samach et al., 2000; Peng et al., 2005).

ACS1 et ACS3 sont hautement homologues, mais il a été démontré qu' ACS3 est un pseudo gène et qu'il représente une version tronquée d'ACS1 (Liang et al., 1995).

ACS2 est induit par le chlorure de lithium, la cycloheximide (CHS) et un stress blessure chez des plants étiolés d'Arabidopsis (Liang et al., 1992). L'éthylène induit son expression graduellement, mais, cette expression diminue lors des expositions prolongées à cette hormone; il est suggéré qu'il existe une rétro-régulation négative de l'ACS2 (Van Der Straeten et al., 1992; Liang et al., 1996).

ACS4 est induit chez les plantules par la cycloheximide, l'acide indole acétique ou un stress blessure (Liang et al., 1992; Abel et al., 1995).

ACS5 est induit par le chlorure de lithium ou par de très faibles concentrations de cytokinines, seulement dans les plantules étiolées (Liang et al., 1996; Vogel et al., 1998).

ACS6 peut être induit par le traitement au cyanide, l'exposition à l'ozone, la blessure, la cycloheximide ou l'acide indole acétique (Arteca et Arteca, 1999; McMahon Smith et Arteca, 2000; Overmyer et al., 2000).

Quant à ACS10, il a été identifié comme l'une des premières cibles du gène « CONTSTANTS », lequel promeut la floraison en réponse à la longueur du jour (lumière) (Samach et al., 2000).

En parallèle aux régulations transcriptionnelles des gènes ACS déjà décrites, il existe une régulation post-traductionnelle. La cytokinine régule, par exemple, la synthèse de l'éthylène par une modification post-



traductionnelle de l'ACS (Vogel et al., 1998). Tatsuki et Mori, (2001) ont décrit la phosphorylation comme un mécanisme de régulation de LeACS2 chez la tomate. L'analyse de mutants d'Arabidopsis surproducteurs d'éthylène comme eto1, eto2 et eto3, démontre une augmentation de la production de l'éthylène liée à une plus grande stabilité des ACS (Chae et al., 2003; Chae et Kieber, 2005).

Les membres de la famille du gène ACO sont également différemment régulés. Au moins deux gènes ACO d'Arabidopsis sont induits par l'éthylène (Alonso et al., 2003a)

Zhong et Burns, (2003) suggèrent qu'un mécanisme de rétroaction est impliqué assurant qu'aucune limitation à la production d'éthylène n'aura lieu une fois que le précurseur ACC est produit. Ainsi, l'induction d'ACO2 dans la région apicale des plantules résulte en l'expansion cellulaire de cette région et en fait, en la formation de la coiffe apicale (Raz and Ecker, 1999). Il apparaît alors que l'ACS est la clef régulatrice pour la biosynthèse de l'éthylène.

Chez le cotonnier, l'éthylène joue un rôle primordial dans l'élongation de la fibre; avec une expression significative d'ACO1-3 (Shi et al., 2006). Ces auteurs signalent que cette hormone peut promouvoir l'élongation cellulaire par l'activation des gènes de la sucrose synthase, de la tubuline et de l'expansine.

Une protéine de type dioxygénase est codée par le gène E8. Ce gène est sur-exprimé pendant la maturation. La protéine a des similarités avec les protéines de la famille ACO, mais elle ne catalyse pas la conversion de l'ACC en éthylène (Deikman et al., 1992). La répression par une construction antisens du gène E8 aboutit à la sur-production d'éthylène et à l'absence de maturation (Penarrubia et al., 1992), tandis que la sur-expression réduit la synthèse d'éthylène (Kneissl et Deikman, 1996). Bien que le mécanisme moléculaire de la fonction du gène E8 ne soit pas encore clair, son expression joue apparemment un rôle dans la répression de transduction du signal éthylène (Giovannoni, 2004).

Cependant, la réponse des plantes à la présence d'éthylène est un phénomène complexe, qui nécessite l'intervention de protéines perceptrices de l'éthylène et pouvant transmettre le signal. De plus, le rôle de l'éthylène est souvent modulé par l'activation ou l'inhibition d'autres voies métaboliques intervenant également dans le développement de la plante.



II) La réponse à l'éthylène

Modulation par d'autres voies métaboliques

La réponse à l'éthylène est souvent connectée avec d'autres processus métaboliques intervenant dans les cellules végétales et qui peuvent euxmêmes affecter la réponse à l'éthylène. Trois niveaux d'interactions entre les signaux sont possibles (Stepanova et Alonso, 2005) :

- Au niveau de la biosynthèse/conjugaison/transport (où une voie régule le niveau des autres),
- Au niveau de la signalisation (en modulant l'activité/niveau d'autres composants de signalisation), et
- Au niveau de la réponse (par la modulation de la réponse à d'autres signaux).

En général, cette modulation de l'activité de l'éthylène est obtenue par d'autres hormones végétales, mais d'autres signaux peuvent également intervenir.

Modulation de la réponse à l'éthylène par d'autres hormones

Les auxines

L'une des interactions hormonales la plus clairement établie au niveau physiologique est celle entre l'éthylène et l'auxine. Il y a longtemps que Morgan et Gausman, (1966) ont montré une implication de l'éthylène dans la régulation du transport de l'auxine, alors que l'auxine peut induire la biosynthèse d'éthylène (Woeste et al., 1999). De nombreux exemples d'interférence entre ces deux hormones peuvent actuellement être cités.

La transcription du gène ACS4 chez A. thaliana est induite par l'auxine et peut être un des premiers composants impliqués dans l'interférence entre l'auxine et l'éthylène (Liang et al., 1992; Abel et al., 1995). Beaucoup de processus tels que l'élongation des cellules, le nombre et la taille des poils racinaires, la morphologie de la feuille etc., sont affectés par l'éthylène et l'auxine (Rahman et al., 2001; Rahman et al., 2002).

L'éthylène et la lumière affectent différentiellement la croissance cellulaire par l'activation du gène HOOKLESS1 (HLS1), lequel module un



facteur de réponse à l'auxine (Li et al., 2004; Li et al., 2006). L'éthylène induit l'expression des gènes WEAK ETHYLENE INSENSITIVE2/ANTHRANILATE SYNTHASE alpha1 (WEI2/ASA1) et WEI7/ANTHRANILATE SYNTHASE beta1 (ASB1) qui codent pour des enzymes impliquées respectivement dans la synthèse du tryptophane et l'a1 et β 1 de l'anthranilate synthase, et qui régulent positivement la synthèse d'auxine dans le méristème apical de la racine (Stepanova et al., 2005).

Les gibbérellines

Les études physiologiques réalisées sur des mutants d'Arabidopsis affectés dans la biosynthèse ou la réponse à l'acide gibbérellique révèlent le rôle de cette hormone dans de nombreux processus du développement de la plante, comme l'élongation cellulaire dans l'hypocotyle ou la racine (Fu and Harberd, 2003). Cependant, il existe une interaction entre l'éthylène et l'acide gibbérellique pour la régulation de l'élongation cellulaire dans les plantules et la formation de la coiffe. L'éthylène a une action régulatrice sur les protéines DELLA (Achard et al., 2003; Cheng et al., 2004; Vriezen et al., 2004) qui sont des protéines nucléaires agissant comme répresseurs de la croissance et ayant des fonctions opposées à celles de l'acide gibbérellique (Richards et al., 2001). La dégradation de cette protéine est stimulée par l'éthylène (Harberd, 2003).

Les cytokinines

Les cytokinines sont des hormones pouvant induire la biosynthèse d'éthylène (Woeste et al., 1999). Les traitements de plantules d'Arabidopsis par la cytokinine permettent la stabilisation de la protéine ACS5. Cela indique que cette hormone joue un rôle très important dans la régulation post transcriptionnelle de la synthèse de l'éthylène (Chae et al., 2003).

Le Jasmonate

Un grand nombre d'interactions positives ou négatives entre l'éthylène et le jasmonate ont été décrites (Ellis et Turner, 2001). Cette hormone et ses dérivés, participent aux réponses de défense contre des champignons phytopathogènes. Lorenzo et al. (2003) ont montré qu'il existait une relation directe entre le jasmonate et l'éthylène en caractérisant un facteur de transcription, l'« Ethylene Response Factor » (ERF1). Ce facteur de transcription, agissant à la fin de la cascade de transduction du signal



éthylène, est contrôlé autant par l'éthylène que par le jasmonate. Il se peut que l'intégration du signal de ces deux hormones régule un ensemble de gènes de réponse, comme le gène PLANT DEFENSIN1.2 (PDf1.2); un gène de réponse aux pathogènes d'Arabidopsis (Lorenzo et al., 2003). L'éthylène, mais aussi le jasmonate, ont des interactions positives dans la régulation de la formation des poils racinaires (Zhu et al., 2006). Il est également possible que le méthyl-jasmonate affecte de façon positive l'union entre l'éthylène et son récepteur ETR1 (Linden and Schaller, 2006).

L'acide abscissique

Des études sur des mutants d'Arabidopsis déficients en réponse au glucose, ont montré des interactions entre ce dernier, l'ABA et l'éthylène (Leon et Sheen, 2003). Zhou et al., (1998) mais aussi Beaudoin et al., (2000) ont montré que l'éthylène, ou des quantités élevées d'ABA, ont des effets antagonistes sur la germination et sur le développement des plantules. Ruonala et al. (2006b) signalent qu'il existe des interactions entre l'ABA et l'éthylène pour réguler le méristème apical. Il existe aussi des interactions entre l'éthylène et l'ABA lors de la mise en place de la dormance chez l'embryon (Ruonala et al., 2006a).

Modulation par d'autres signaux

Chez les plantes, le glucose est une source d'énergie mais il est aussi porteur de signaux et d'informations (Sheen et al., 1999). Comme décrit précédemment, des études sur des mutants d'Arabidopsis déficients en réponse au glucose, ont montré des interactions entre ce dernier, l'ABA et l'éthylène (Leon and Sheen, 2003). Des quantités élevées de glucose ont des effets antagonistes à ceux de l'éthylène sur la germination et le développement des plantules.

Des mutants insensibles à l'éthylène montrent une hypersensibilité au glucose. Par ailleurs, l'activation de la réponse à l'éthylène par l'addition d'éthylène exogène atténue l'effet de ce sucre (Zhou et al., 1998; Leon et Sheen, 2003). Au niveau moléculaire, Yanagisawa et al. (2003) ont montré que le glucose augmente la dégradation de l »'Ethylene Insensitive 3 » (EIN3), un facteur de transcription agissant à la fin de la cascade du signal éthylène. De



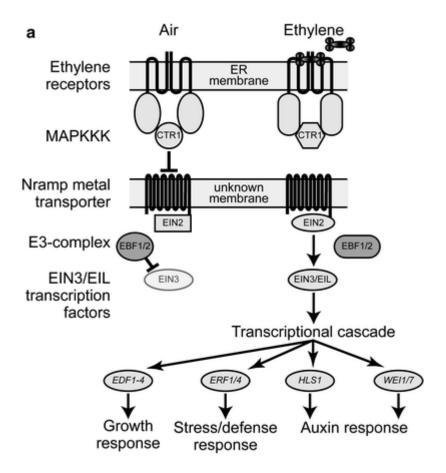


Figure 4. Transduction du signal éthylène. En absence d'éthylène, le récepteur active CTR1, un régulateur négatif qui bloque le signal en aval. Après CTR1, la quantité disponible d'EIN3 est réduite par l'action du protéasome qui implique l'action d'EBF1 et d'EBF2. La perception de l'éthylène inactive CTR1 et empêche la dégradation d'EIN3, ce qui active la transmission du signal. (d'après Etheridge et al., 2006).



plus, la sur-accumulation d'EIN3 diminue la sensibilité au glucose chez des plants d'Arabidopsis transformés. L'addition d'éthylène, par contre, augmente la stabilité de cette protéine (Guo et Ecker, 2003; Potuschak et al., 2003).

2) Perception et transduction du signal éthylénique

Une des premières observations concernant l'effet de l'éthylène, montrait que de jeunes plantes mises en culture en présence d'éthylène adoptaient une morphologie très particulière qui fut appelée 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. Ce phénomène de triple réponse a servi de base à l'étude du mécanisme de perception et de transduction du signal éthylénique suivant trois approches : génétique, moléculaire et biochimique.

L'éthylène est perçu par plusieurs protéines intégrées au réticulum endoplasmique (RE), un endroit peu commun pour un récepteur d'hormone mais compatible avec la diffusion de l'éthylène dans les environnements aqueux et lipidiques (Chen et al., 2002). Ces protéines, appelées récepteurs d'éthylène, sont semblables aux récepteurs bactériens à deux composantes. Ces récepteurs consistent en une protéine senseur et une protéine indépendante qui est un régulateur de la réponse, les deux fonctionnant ensemble. Le système consiste en un « domaine histidine » comme senseur, qui autophosphoryle une histidine interne en réponse au signal, et un « domaine récepteur » qui active des composés plus bas dans la cascade du signal quand il reçoit le groupement phosphate de l'histidine du « domaine histidine » sur son résidu aspartate (Wurgler-Murphy et Saito, 1997; Pirrung, 1999). La figure 4 montre la cascade de la transduction du signal éthylène.

Chez Arabidopsis il y a cinq types de récepteurs appartenant à deux sous-familles. Une sous-famille comprend l'<u>ETHYLENE RECEPTOR1</u> (ETR1) (Chang et al., 1993) et l'<u>ETHYLENE RESPONSE SENSOR 1</u> (ERS1). Ces protéines se caractérisent par trois domaines trans-membranaires et une zone conservée de l'histidine-kinase (Hua et al., 1995). L'autre sous-famille de récepteurs inclue <u>ETR2</u> (Sakai et al., 1998), <u>ETHYLENE INSENSITIVE 4</u> (EIN4)



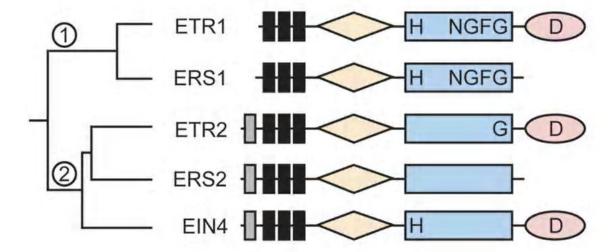


Figure 5. Différentes familles de récepteurs d'éthylène chez A. thaliana. Il existe deux sous-familles de récepteurs d'éthylène Les rectangles noirs représentent les segments transmembranaires. Les rectangles gris correspondent à un quatrième segment hydrophobe, qui serait un signal putatif dirigeant la protéine vers la voie de sécrétion. Le diamant représente le domaine GAF dont le rôle est toujours inconnu, le rectangle bleu indique le domaine de l'Histidine Kinase. L'ovale indique le domaine receveur. Les sites conservés pour la phosphorylation sont l'Histidine (H) et l'Aspartate (D), mais aussi, les motifs conservés (NGFG) dans le domaine de l'Histidine Kinase. Ces sites sont indiqués s'ils sont présents dans les différents types de récepteur. (D'après Schaller et Kieber, 2002).



(Hua et al., 1995) et <u>ERS2</u> (Hua et al., 1998). Ces dernières protéines ont aussi trois domaines transmembranaires plus un peptide signal putatif, qui dirigerait la protéine vers la voie de sécrétion, et une zone dégénérée de l'histidine-kinase. La figure 5 montre la structure primaire des cinq gènes récepteurs de l'éthylène chez Arabidopsis thaliana. Moussatche et Klee, (2004) ont déterminé que les protéines membres de la deuxième sous-famille ont une activité Sérine Kinase ; ils suggèrent de nouvelles voies dans la traduction du signal éthylène depuis ces récepteurs jusqu'aux composés plus tardifs dans la cascade signalétique.

Seuls ETR1, ETR2 et EIN4 possèdent le domaine receveur déjà décrit. Cependant, l'homodimérisation d'ETR1 et d'ERS1 a été démontrée (Schaller et al., 1995; Hall et al., 2000). Ainsi, les récepteurs dont le domaine receveur manque, comme ERS1 et ERS2, pourraient utiliser le domaine récepteur des autres récepteurs pour la formation d'hétérodimères (Hua et al., 1998).

Le segment trans-membranaire fonctionne comme un domaine d'entrée du signal basé sur sa capacité à lier l'éthylène. L'unité fonctionnelle du récepteur semble être un pont disulfure, qui serait un site de liaison à l'éthylène (Rodriguez et al., 1999). Il a été montré que la dimérisation est liée à la presence de deux résidus Cys placés à l'extrémité N terminale de la protéine (Schaller et al., 1995). L'éthylène se lie à ses récepteurs par l'intermédiaire d'un cofacteur cuivre, qui est probablement fourni par le transporteur de cuivre RAN1 (Rodriguez et al., 1999).

Des études physio-génétiques indiquent que la liaison de l'hormone engendre l'inactivation de la fonction du récepteur ce qui constitue donc une régulation négative (Hua and Meyerowitz, 1998). En l'absence d'éthylène, il est présumé que les récepteurs sont dans un stade fonctionnellement actif. Ils activent constitutivement une protéine « Raf-like serine/threonine (Ser/Thr) kinase » nommée Constitutive Triple Response (CTR1) qui est également un régulateur négatif de la cascade du signal éthylène (Kieber et al., 1993).

CTR1 interagit avec EIN2 de façon inconnue (Klee, 2004). EIN2 est une protéine membranaire dont la fonction n'est pas encore précisée (Roman et al., 1995; Alonso et al., 1999). Un aspect important est qu'elle constitue le premier régulateur positif du signal éthylène. EIN2, le gène qui code pour cette protéine, est un gène en copie unique chez Arabidopsis et il est le seul gène connu pour lequel la perte de fonction a comme conséquence la perte totale de



réponse à l'éthylène (Chen et Bleecker, 1995; Roman et al., 1995). EIN2 contient 12 segments transmembranaires. L'extrémité hydrophobe N-terminale montre une similitude avec les protéines de transport (« Nramp metal-ion transport proteins »).

EIN2 stimule la transcription d'EIN3 dans la continuité de la cascade du signal éthylène. EIN3 est une protéine spécifique des plantes. Elle est localisée dans le noyau de la cellule et elle est aussi un régulateur positif du signal. Le gène qui code pour ce facteur de transcription appartient à une famille multigénique qui contrôle les protéines EIN3 et des « EIN3-Like » (EIL) (Chao et al., 1997).

EIN3 stimule la transcription en se liant aux promoteurs d'autres facteurs de transcription comme les ERFs (Ethylene Response Factor) (Solano et al., 1998; Alonso et al., 2003b), une famille de facteurs de transcription auparavant appelée EREBP (Ethylene Response Element Binding Protein; (Ohme-Takagi et Shinshi, 1995; Fujimoto et al., 2000).

Les facteurs de transcription ERFs appartiennent à la superfamille AP2/ERF définie par la présence du domaine AP2/ERF, qui consiste en 60 – 70 acides aminés impliqués dans la liaison à l'ADN. La superfamille AP2/ERF a été elle-même divisée en deux familles sur la base du nombre de domaines AP2 présents (Riechmann et Meyerowitz, 1998); l'AP2-like (Jofuku et al., 1994) et le ERF-like (Ohme-Takagi et Shinshi, 1995). La première famille de protéines se caractérise par la présence de deux domaines répétés de l'AP2/ERF; tandis que les membres de la famille ERF n'en ont qu'un. Les membres de la famille RAV, contiennent un domaine B3, qui est un domaine de liaison à l'ADN conservé chez d'autres facteurs de transcription, il inclut le VP1/ABI3 en plus d'un domaine AP2 (Kagaya et al., 1999; Sakuma et al., 2002; Nakano et al., 2006).

La famille ERF est elle-même divisée en deux sous-familles : la sous-famille ERF et la sous-famille CBF/DREB (Sakuma et al., 2002). Le domaine AP2 a été identifié pour la première fois chez Arabidopsis comme un domaine répété dans la protéine AP2. Cette protéine est impliquée dans le développement de la fleur (Jofuku et al., 1994). Le domaine ERF a été identifié pour la première fois chez le tabac (Nicotiana tabacum) comme interagissant avec la « GCC-box », un cis élément régulateur identifié dans les promoteurs de



The Tomato ETR Family

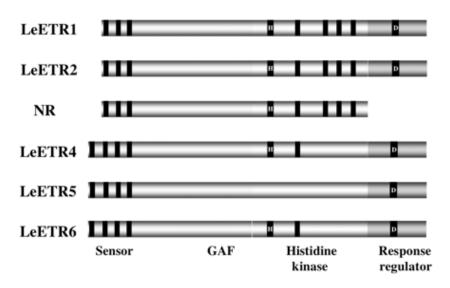


Figure 6. Les récepteurs d'éthylène identifiés chez la tomate. Cette figure montre les différents récepteurs identifiés chez la tomate par rapport aux types décrits dans la figure 5 (D'après Klee, 2004).



gènes régulés par l'éthylène (Ohme-Takagi et Shinshi, 1995). La figure 4 montre un schéma général de la signalisation de l'éthylène.

Le génome de la tomate contient au moins six gènes de récepteurs d'éthylène (figure 6). LeETR1, LeETR2, qui s'expriment constitutivement durant le développement de la plante (Zhou et al., 1996; Lashbrook et al., 1998). Le gène du récepteur Never Ripe (NR) est régulé positivement durant l'anthèse (Wilkinson et al., 1995; Payton et al., 1996). L'expression de ce gène diminue approximativement de 10 fois jusqu'au début de la maturation, puis, lors de la crise climactérique elle augmente environ de 20 fois (Lashbrook et al., 1998). LeETR4, LeETR5 et LeETR6 sont hautement exprimés dans les fleurs et les fruits mais peu dans les tissus végétatifs (Tieman et al., 2000). Seuls NR et LeETR4 sont induits pendant les attaques par des agents pathogènes. Chaque récepteur a un profil d'expression spatio-temporel différent selon le stade de développement ou le stimulus perçu par la plante.

Afin de bien comprendre la régulation des récepteurs d'éthylène chez les plantes, les recherches ont porté pendant ces dernières années sur l'étude de mutants de ces récepteurs chez Arabidopsis thaliana. Des analyses génétiques et biochimiques des récepteurs d'éthylène ont indiqué que les premiers génotypes mutants isolés : etr1-1, etr1-2, etr1-3, etr1-4, etr2-1 et ein4-1 ont été identifiés comme dominants et insensibles à l'éthylène. Ils portent des mutations non sens dans le domaine N-terminal de liaison à l'éthylène (Chang et al., 1993; Roman et al., 1995; Hua et al., 1998; Sakai et al., 1998). Des mutations de même type dans un des domaines transmembranaires ont été réalisées dans les gènes ERS1 et ERS2 et ont donné le même phénotype d'insensibilité à l'éthylène (Hua et al., 1995). L'isolement d'allèles responsables de la perte de fonction de ETR1, ETR2, EIN4, et ERS2 par criblage de suppresseurs intra géniques de mutants dominant a été accompli par Hua et Meyerowitz, (1998).

Malgré les différences structurales entre les récepteurs; il existe des redondances (ou compensations de fonction) entre eux (Hua et Meyerowitz, 1998; Cancel et Larsen, 2002; Zhao et al., 2002; Wang et al., 2003). Les mutations de type « simple perte de fonction » ont peu ou pas d'effet sur la transduction du signal éthylène. Cependant, en association, les mutants montrent la triple réponse constitutive; cela indique qu'il existe des superpositions fonctionnelles entre les récepteurs. Le mutant triple perte de



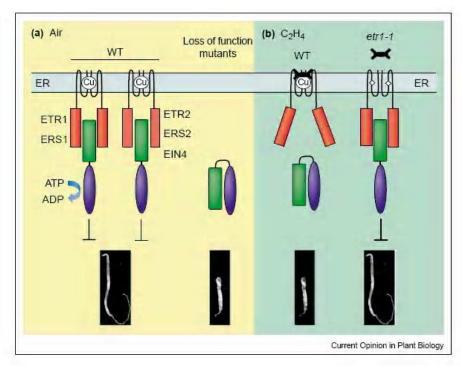


Figure 7. Phénotype présenté par de plantules étiolées d'Arabidopsis en absence (a) ou en présence (b) d'éthylène. Le type sauvage présente un phénotype normal, en présence d'éthylène il montre la triple réponse. Le mutant « loss of function » présente la triple réponse constitutivement en absence d'éthylène. Le mutant dominant etr1-1 est insensible à l'éthylène. (D'après Guo et Ecker, 2004)



fonction etr1;etr2;ein4 montre une triple réponse constitutive quand il pousse dans un milieu sans éthylène (figure 7). La quadruple perte de fonction etr1;etr2;ein4;ers2 montre une triple réponse encore plus sévère que le triple mutant. Ces plantes sont de petite taille, apparemment due à la réduction de l'expansion cellulaire (Hua et Meyerowitz, 1998).

Mon travail a consisté en l'identification et la caractérisation de quelques gènes de récepteurs d'éthylène chez les caféiers en cherchant d'éventuelles relations entre ces gènes et des caractéristiques agronomiques ou biochimiques.

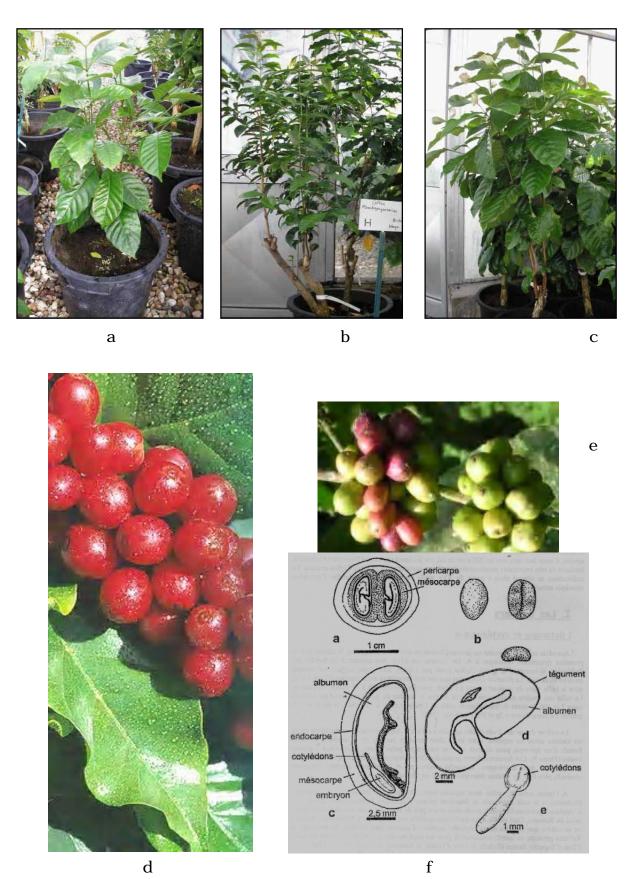


Figure 8. Quelques espèces de Coffea: (a) C. canephora, (b) C. pseudozanguebariae, (c) C. dewevrei. (d) Fruits de C. arabica et C. canephora (d et e). (f) Coupes longitudinales et transversale de fruit de C. canephora.



B) Les Caféiers.

Les caféiers sont des plantes pérennes, des arbustes ou des arbres, dont la hauteur varie de 1 à 2 mètres pour les espèces les moins développées (C. humilis et C. heterocalyx) à plus d'une vingtaine de mètres pour les plus grandes (C. liberica). L'arbre présente une architecture régulière, possédant une tige unique, dressée (orthotrope) et régulièrement ramifiée à tous ses nœuds. Les rameaux latéraux supra axillaires restent obliques (plagiotropes plus ou mois ramifiés), relativement grêles et souples : ce sont les branches florifères. Les feuilles sont persistantes (exceptées pour C. racemosa en saison sèche) et montrent une grande diversité de forme (arrondies, allongées, lancéolées) et de taille variable (entre 5-20 cm) selon les espèces.

La différenciation des boutons floraux sur les nœuds des rameaux plagiotropes a lieu à la fin de la saison des pluies. Ces initiations florales échelonnées n'évoluent pas durant la saison sèche mais l'apparition des premières précipitations conduit à des floraisons groupées. Ainsi, la floraison apparaît vers le sixième jour après les premières précipitations pour C. racemosa et le dixième jour pour C. eugenioides. Les fleurs sont hermaphrodites et groupées en inflorescences ou cymes; elles sont tubuleuses, de couleur blanche et odorantes. L'ovaire, infère, est bicarpellé et surmonté d'un disque nectarifère, rendant les fleurs très attractives aux insectes. Les carpelles sont uniovulés.

La durée du cycle de fructification varie de onze semaines pour les espèces les plus précoces (comme C. racemosa, C. pseudozanguebariae et C. sessiliflora) à plus de dix mois pour les espèces les plus tardives (comme C. liberica et C. congensis). Les fruits, appelés drupes ou cerises, de forme ovoïde-elliptique, souvent pédonculés, sont constitués d'un exocarpe de couleur verte au stade immature et de couleur rouge ou jaune quand il arrive à la maturation et d'un mésocarpe charnu (mucilage) (figure 8). Dans la région apicale, le fruit possède une petite cicatrice circulaire appelée disque, qui correspond au site où ont été unis les autres verticilles floraux. Les fruits contiennent normalement deux graines, convexes sur une face, aplaties sur l'autre.



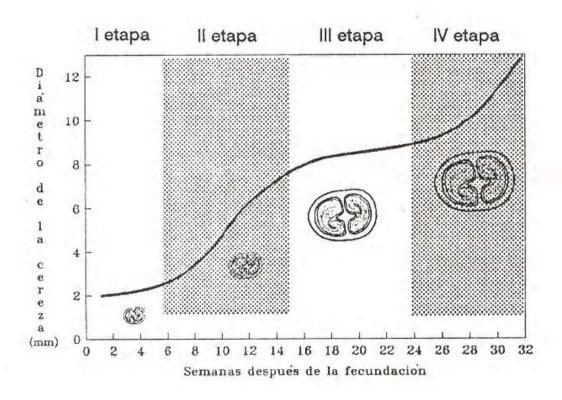


Figure 9a. Cycle de fructification de C. arabica. Etapes de développement du fruit. (D'après Ascanio, 1994).



Un défaut de pollinisation ou un avortement post-zygotique précoce, conduisent à l'existence de fruits à une seule graine : les caracolis, tandis qu'un avortement tardif de l'albumen mène à la présence d'une loge vide.

Chez C. arabica, la floraison arrive entre le 10^{ème} et le 15^{ème} jour après les premières précipitations. Au Venezuela, elle a lieu durant les mois d'avrilmai ; le cycle de fructification dure de 8 à 9 mois et tout ce processus est marqué par quatre étapes bien différenciées:

Première étape : entre 4 et 6 semaines après la fécondation. Cette période se caractérise par une lente augmentation de poids et de volume. Durant cette étape, la présence ou l'absence de pluie n'influe pas vraiment sur le développement du fruit.

Deuxième étape : entre les semaines 7 et 16 après la fécondation. Lors de cette étape, le fruit augmente rapidement de volume et de poids grâce à la croissance du péricarpe (il se produit aussi une rapide expansion cellulaire). Le fruit acquiert 80-84% d'humidité. Les deux espaces où sont placés les semences s'étendent jusqu'à leurs tailles définitives et se remplissent avec un liquide laiteux (qui sera le futur endosperme) et l'endocarpe se lignifie. Pendant cette période, la disponibilité en eau est très importante, car la taille qu'acquièrent les cavités où sont placées les futures graines dépend de cette disponibilité hydrique. A la fin de cette étape, le développement de l'endosperme commence.

Troisième étape : entre les semaines 17 et 27 après la fécondation. Pendant cette période, l'aspect extérieur évolue peu. On assiste à la formation de l'endosperme. Durant cette période, la demande en éléments minéraux est forte.

Quatrième étape : entre les semaines 28 et 33 après la fécondation se déroule la maturation. Elle est caractérisée par un rapide développement de la matière sèche et du volume du péricarpe, la perte de la chlorophylle dans le fruit, la production d'éthylène et un changement de couleur. Cette étape se déroule pendant la saison sèche.

La figure 9, adapté d'Ascanio, (1994) montre la croissance moyenne des fruits de C. arabica.



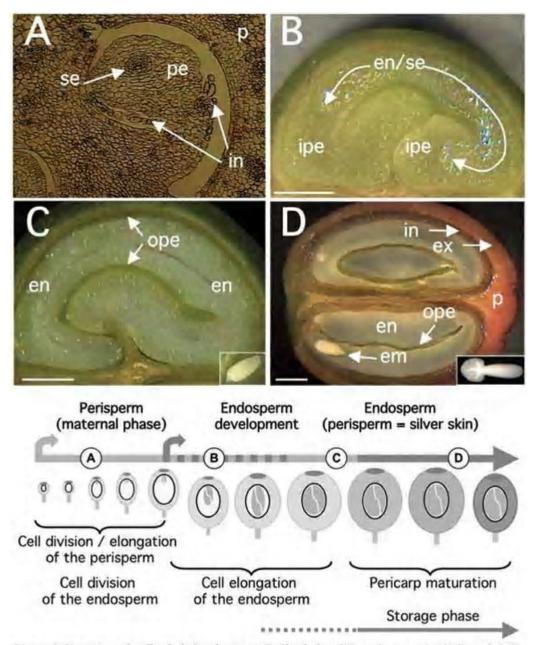


Figure 2. Key steps of coffee fruit development. Coffee fruits of *C. arabica* var. Acaiá Cerrado MG1474 were harvested on different days after flowering (DAF) and sectioned for analysis (Estanislau,
2002). A: ovary after anthesis (0-60 DAF showing the growing perisperm (pe) tissue, the integuments
(in) and the young embryo sac (se) that will further develop into the endosperm (en). Cell
layers of the future pericarp (p) are also indicated (x 60). B: transversal section of immature
fruit at 90 DAF showing the pericarp (p) and the liquid endosperm tissue (en), also referred to
as the "true seed" (se), which grows (arrows) absorbing the inner perisperm tissue (ipe). C:
transversal section of immature fruit between 120-150 DAF showing the remaining folded outer
perisperm layer (ope) enclosing the completely milky endosperm. D: longitudinal section of
mature cherry fruits at 230-240 DAF showing the two developed mature seeds enclosing one
cotyledonary mature embryo (em) inside the solid endosperm or isolated (right corner). Internal
(in) and external (ex) parts of the mesocarp are also indicated. Bars from B to D represent 2 mm.
Below, is presented a schematic graph of tissue changes occurring during coffee fruit development.

Figure 9b. Développement du fruit chez Coffea arabica. (D'après De Castro et Marraccini, 2006).



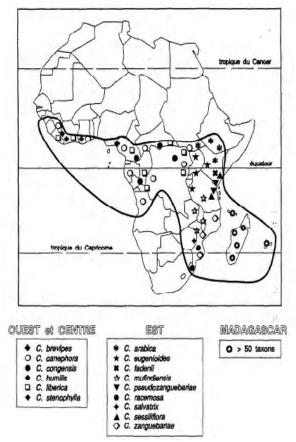


Figure 10. Distribution géographique des groupes phylogénétiques des caféiers (D'après Anthony, 1992).

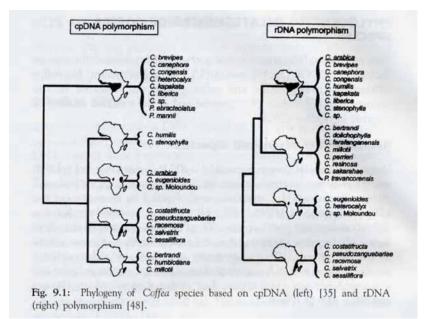


Figure 11. Phylogénie des espèces basées sur l'ADN chloroplastique (gauche) et l'ADN ribosomal (droite). Adapté de Lashermes et al., (1997); Cros et al., (1998)



Diversité des caféiers.

appartient à la famille genre Coffea Rubiaceae phylogénétiquement très proche du genre Psilanthus (Davis et al. 2005). Le genre Coffea a été classifié en deux sous-genres : Sous-genre Coffea et sousgenre Baracoffea. Le genre Coffea a une répartition limitée au continent africain, Madagascar et aux îles mascareignes (La Réunon, Maurice et Rodrigues). Les taxons du sous-genre Baracoffea sont inféodés aux milieux arides des plaines côtières de la Somalie et du Kenya ainsi qu'à la côte occidentale de Madagascar (Leroy, 1983; Bridson, 1987) Par contraste, toutes les espèces du sous-genre Coffea sont endémiques de la zone forestière intertropicale. Elles se répartissent en trois ensembles biogéographiques, séparés par le Canal du Mozambique et la dorsale du Kivu, à l'est du Zaïre. La figure 10, adapté d'Anthony, (1992) montre ces régions: 1) les îles de l'Océan Indien, 2) l'Afrique orientale, 3) l'Afrique centrale et occidentale. A Madagascar, la diversité semble extrême: 57 taxons ont été décrits et 47 recensés dans toute l'Afrique. Sur le continent, la distribution des espèces est inégale selon les régions. Les façades océaniques de l'Afrique centrale et de l'Afrique orientale semblent plus riches. Une attention particulière doit être réservée à l'espèce C. arabica car c'est la seule espèce endémique du plateau Abyssin (Bertrand et al., 2003).

Lashermes et al. (1997) ont étudié la variation des séquences nucléaires de type ITS2 (Internal Transcribed Sequences) chez différentes espèces de Coffea. Les analyses phylogénétiques ont permis de distinguer quatre groupes biogéographiques. Afrique central, Madagascar, Afrique central-est et Afrique de l'est Cros et al. (1998), en analysant la diversité de l'ADN chloroplastique, ont distingué les mêmes groupes, mais les espèces C. humilis et C. stenophylla sont classées dans un autre groupe. L'espèce tétraploïde C. arabica est classée dans le même groupe que son géniteur maternel probable : C. eugenioides (figure 11).

Structure du génome des caféiers

Presque toutes les espèces de caféiers sont diploïdes avec 2n=2x=22 chromosomes, à l'exception de C. arabica, qui est amphidiploïde avec 2n=4x=44 chromosomes. Selon Lashermes et al., (1999), cette espèce résulterait de l'hybridation entre deux espèces diploïdes : C. canephora et C. eugenioides.

L'espèce C. arabica diffère aussi des espèces diploïdes par son mode de reproduction. Cette espèce est préférentiellement autogame mais avec un taux d'allo fécondation pouvant atteindre 11% (Carvalho et Monaco, 1964). Parmi les espèces diploïdes, toutes sont allogames avec deux exceptions identifiées à ce jour : C. heterocalyx (Rakotomalala, 1993) et C. moloundou (Anthony, 1992)

Le système d'incompatibilité gamétophytique mis en évidence chez C. canephora est monogénique et polyallélique (Berthaud, 1986). Le locus S qui détermine ce caractère a été cartographié avec des marqueurs RFLP (Lashermes et al., 1996) ou des marqueurs AFLP (Coulibaly et al., 2002). L'allogamie est un des principaux caractères qui expliquent la grande variabilité génétique observée chez les espèces diploïdes.

Cette grande diversité est à mettre en opposition avec la relative homogénéité dans l'espèce cultivée C. arabica et représente une ressource génétique inestimable pour l'amélioration des caféiers cultivés. C'est pourquoi l'étude de la diversité des caféiers est aujourd'hui un axe majeur des recherches sur le caféier. La conservation et la valorisation de la diversité existante sont très importantes car elles sont à la base de tous les programmes d'amélioration génétique.

Le germoplasme de C. arabica collecté en Ethiopie, au Kenya et au Yémen par des missions menées essentiellement par la FAO, l'IRD (ex ORSTOM), le CIRAD et l'IPGRI a été multiplié et conservé dans des collections. Actuellement, des collections majeures pour la conservation de ce germoplasme existent dans plusieurs pays : Cameroun, Ethiopie, Kenya, Tanzanie, Côte d'Ivoire, Madagascar, Inde, Costa Rica, Brésil, Colombie, et Venezuela. La diversité existante dans l'espèce C. canephora est représentée par des collections mises en place en Côte d'Ivoire, au Cameroun, à Madagascar et en Inde. Dans les collections de Côte d'Ivoire et de Madagascar, on retrouve la plus grande partie de la diversité génétique des caféiers diploïdes (Anthony et al., 1999). Ce « pool génétique » renferme un grand



Tableau 1. Principaux caractères d'intérêt chez différentes espèces diploïdes de Coffea (d'après Anthony et al., 1999))

Caractère d'intérêt	Espèce			
Resistance a la rouille orangee	C. canephora; C. pseudozanguebariae;			
(Hemileia vastatrix)	C. liberica; C. eugenioides ; C. salvatrix			
Resistance a l'antracnose des	C. canephora			
baies (CBD)				
Resistance aux nematodes	C. canephora; C. liberica; C. congensis			
Resistance a la mineuse des	C. racemosa ; C. stenophyla			
feuilles (Perileucoptera coffeella)				
Faible contenu en caféine	C. pseudozanguebariae			
Tolérance aux basses	C. liberica			
températures	C. Ilberica			
Adaptation à la sécheresse et aux	C. racemosa			
climats chauds	C. racemosa			
Adaptation aux sols inondes	C. congensis			
Fructification groupée et	C. liberica ; C. dewevrei			
granulométrie	C. IIDCIICA, C. UEWEVIEI			



nombre de gènes d'intérêt agronomique. Le tableau 1 donne quelques-uns des caractères intéressant identifiés dans le pool génétique des caféiers diploïdes.

La sélection et l'amélioration des caféiers

Seulement deux espèces de tout le pool génétique des caféiers sont cultivées intensivement à travers le monde : C. arabica, qui produit un café de meilleure qualité et qui a la préférence des consommateurs, et C. canephora dont la qualité est inférieure. La première espèce est la plus cultivée dans les régions d'altitude d'Afrique et d'Amérique du Sud et Centrale; la deuxième dans les régions intertropicales humides de basse altitude d'Afrique, d'Asie et du Brésil.

Mise en culture

L'espèce Coffea arabica a été décrite par Linné en 1783, et nommée ainsi car il pensait que ce caféier poussait en Arabie. A cette époque, le café n'était connu que des Arabes qui avaient le monopole du commerce du café. Ce monopole n'a été supprimé qu'au 18e siècle par la Compagnie des Indes orientales. A l'origine, le caféier arabica ne poussait que dans les forêts de haute altitude du sud de l'Ethiopie. De là, il a été emmené d'abord par les Arabes vers les vallées humides du Yémen (probablement au cours du 11ème siècle). Plus tard, la culture du caféier s'est étendue vers l'Inde et le Sri Lanka par les Britanniques, vers Java par les Hollandais, vers l'île de la Réunion par les Français. Elle s'est ensuite dispersée en provenance d'Amsterdam ou de Paris jusqu'aux Antilles et en Amérique du Sud au début du 18ème siècle. Au Venezuela, le caféier a été introduit vers 1730, mais c'est en 1783 que la première plantation commerciale a été mise en place à Chacao, Caracas. Les caféiers arrivent à Táchira, grâce à l'initiative de Gervasio Rubio, qui les y installe en 1794 à la ferme la Yegüera, dans le voisinage du village qui plus tard, en 1855, sera nommée Rubio. Finalement, la culture du caféier a été reintroduite sur le continent africain. Entre-temps, d'autres espèces de caféiers ont été découvertes et décrites, en particulier à Madagascar et sur les îles Mascareignes.



Comme nous venons de le décrire, la mise en culture des caféiers est récente: trois siècles pour C. arabica et à peine plus d'un pour C. canephora. Elle a été marquée par une importante dispersion de matériel végétal mais à partir de très peu de génotypes de départ conduisant notamment à un appauvrissement de sa base génétique. Ainsi, on estime que seulement trois introductions sont à l'origine de tous les caféiers C. arabica cultivés sur le continent américain: C. arabica var. typica, C. arabica var. bourbon et, plus récemment, un hybride naturel, appelé Hybride de Timor, que l'on peut assimiler à un caféier C. arabica ayant introgressé des gènes de l'espèce diploïde C. canephora.

L'amélioration des caféiers

Les critères de sélection et leur hiérarchisation varient selon l'espèce cultivée et le pays concerné. Par ailleurs, les schémas d'amélioration sont en relation directe avec le mode de reproduction.

La sélection de C. canephora est dite végétative (clonale) car elle consiste à trier les individus les plus performants parmi diverses introductions ou descendances, puis à les multiplier par bouturage. Les plantes de l'espèce C. canephora sont vigoureuses et résistantes à de nombreuses maladies, nématodes et insectes (d'où son nom de Robusta). En revanche, ses graines contiennent deux à trois fois plus de caféine. La boisson qui en résulte est plus amère et l'arôme est moins développé que chez C. arabica. Les principaux objectifs des programmes d'amélioration génétique ont été orientés vers l'augmentation du rendement, de la granulométrie, de la résistance aux prédateurs et aux agents pathogènes, vers l'adaptation à la sécheresse, aux zones inondables, mais aussi vers l'amélioration des qualités organoleptiques et ce, en fonction de l'espèce cultivée considérée.

Grâce aux marqueurs enzymatiques, Berthaud (1986) a mis en évidence l'existence de deux groupes génétiques d'origine différente au sein de l'espèce C. canephora : 1) les « Guinéens », localisés en Afrique de l'ouest (Côte d'Ivoire - Guinée) ; 2) les « Congolais », localisés en Afrique centrale, région du Congo - Cameroun - République Centrafricaine. L'existence d'hétérosis chez les hybrides issus de croisements entre ces deux populations, a permis d'avancer un schéma de sélection récurrente réciproque en Côte d'Ivoire. L'augmentation



du rendement et de la granulométrie atteint dès la fin du première cycle de sélection a été montrée par Leroy et al. (1997).

Comme pour la plupart des plantes autogames, la sélection de C. arabica est de type généalogique, après avoir recombiné les caractères. Pour transférer des caractères particuliers, quatre stratégies de sélection ont été adoptées par les programmes d'amélioration génétique :

- Sélection généalogique à partir de cultivars locaux.
- Sélection généalogique après hybridations intra spécifiques.
- Sélection par backcross après hybridations inter spécifiques.
- Propagation directe par embryogenèse somatique de variétés hybrides.

Dans un pays producteur comme le Venezuela, les objectifs des programmes d'amélioration génétique ont été basés sur l'obtention de variétés à port homogène, de petite taille, plus productives, de bon rendement en café marchand, et mieux adaptées aux conditions environnementales locales. Par ailleurs la résistance à la rouille orangée (Hemileia vastatrix) a aussi été recherchée et tout cela sans diminuer la qualité de la boisson. D'autres aspects sont importants pour la sélection de nouvelles variétés comme la résistance aux nématodes (Meloidogine exigua, Pratilechus sp) et à l'anthracnose des fruits (Colletotrichum kahawae).



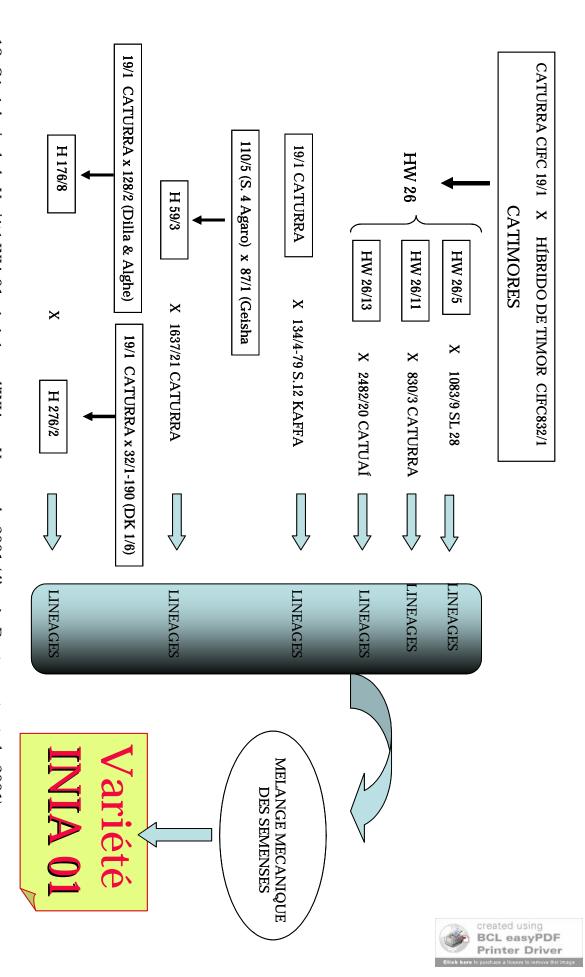


Figure 12. Généalogie de la Variété INIA 01 généré par l'INIA au Venezuela 2001 (d'après Bustamante et al., 2001)

L'Hybridation chez C. arabica

L'Hybridation intra spécifique

En 1935, le phénotype Caturra a été découvert au sein de la variété Bourbon. Il présente des entrenœuds courts, une taille réduite et un port compact. D'autres mutations du Bourbon comme le « Pacas, Villa Sarchis » sont génétiquement comparables au Caturra. Cette variété est cultivée au Venezuela en exploitation de haute densité.

Comme résultat des différents programmes d'amélioration de C. arabica, quelques cultivars ont été développés dans des pays producteurs: Mundo Novo au Brésil en combinaison des variétés Typica et Bourbon; Catuai au Brésil en combinaison de Caturra et Mundo Novo. Au Mexique, la variété Garnica a été développée à partir d'un schéma identique et elle peut être considérée comme similaire à Catuai.

L'Hybridation inter spécifique

Plusieurs hybrides naturels ont été identifiés dans différentes zones de culture comme en Indonésie, en Inde ou en Nouvelle Calédonie. Ces hybrides sont le résultat de croisements inter spécifiques spontanés apparus dans les plantations (Le Pierrès, 1995). Des hybrides comme le Kalias ou le Hamilton (C. arabica x C. liberica); le Kawisari (C. liberica x C. arabica); le Bogor-Prada (C. canephora x C. arabica) sont décrits par cet auteur. L'hybride le plus utilisé dans les programmes d'amélioration génétique a été l'Hybride de Timor (C. canephora x C. arabica). C'est à partir de cet hybride que l'on a transféré la résistance à la rouille orangée et au scolyte des baies (Coffee Berry Borer CBD) a de nouvelles variétés (Colombia, Costa Rica 95, IHCAFE90, Bramon I, etc). Au Venezuela, une nouvelle variété (INIA 01) dont les sources de résistance proviennent de l'hybride de Timor et d'une origine Ethiopienne de C. arabica (figure 12), a été récemment mise à disposition des agriculteurs (Bustamante et al., 2001).

L'hétérosis, ou vigueur hybride, entre différentes populations de C. arabica a été mise en évidence. En Ethiopie, Ameha et Belachew, (1985) montrent un hétérosis de 30% à 60% pour des hybrides de deux populations sylvestres de C. arabica sauvages. Au Costa Rica, (Bertrand et al., 2005) ont déterminé une hétérosis entre 22% et 47% quand l'hybride F_1 catimor x



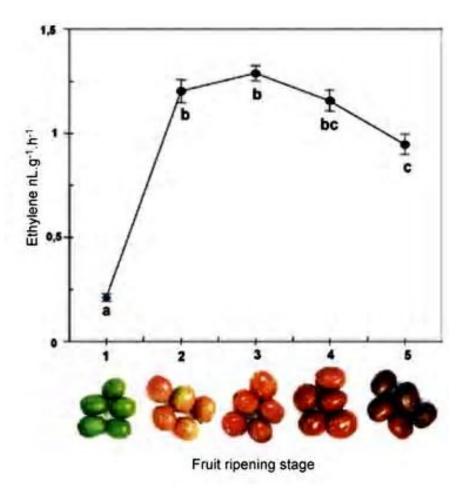


Figure 13. Production d'éthylène pendant le développement et la maturation par les fruits de Coffea arabica (d'après Pereira et al., 2005).



sylvestre (ET26 ou ET6) est comparé au meilleur parent. D'après ces résultats, les hybrides F_1 montrent des caractéristiques importantes de vigueur, productivité, résistance et adaptabilité (Bertrand et al., 1999). Un des grands avantages des F_1 est que l'on peut accumuler dans un seul génotype des résistances complémentaires aux agents pathogènes comme c'est le cas des gènes dominants pour la résistance à la rouille orangé, aux nématodes (Bertrand et al., 1999), mais aussi, l'introgression de gènes de C. arabica sylvestre dans le génome catimor, pour augmenter sa qualité organoleptique.

L'éthylène chez les caféiers

Beaucoup des travaux publiés montrent l'influence de l'éthylène dans la maturation des fruits de caféier (Browin et Cannell, 1970; Oyebade, 1971; Upegui et Valencia, 1972; Snoeck, 1973; Oyebade, 1976; Snoeck, 1977; Gomide et al., 1978; Opile, 1978; Sudhakara et al., 1978; Winston et al., 1992; Sondahl et Petracco, 1997). Pereira et al., (2005) ont déterminé que la production auto catalytique d'éthylène par les fruits verts de caféiers est très faible mais qu'elle augmente considérablement durant l'étape initiale de la maturation. Pendant les étapes finales de la maturation des fruits, et durant la sur-maturation on observe une diminution de la concentration d'éthylène. Ces observations sont caractéristiques des fruits climactériques La figure 13 montre la progression de la production d'éthylène chez le caféier (Coffea arabica).

OBJECTIFS DE RECHERCHE

La qualité du café boisson est devenue une des demandes les plus fortes des consommateurs. Cette qualité dépend de nombreux paramètres génétiques, agronomiques et technologiques. La caféine et les acides chlorogéniques figurent parmi les composés qui s'accumulent dans les grains verts de café et qui entrent dans la détermination de la qualité finale de la tasse de café. Par conséquent, la connaissance des aspects du développement et de la maturation des fruits pendant lesquels intervient l'accumulation de ces composés est très importante.

La maturation des fruits est un phénomène complexe génétiquement programmé, caractérisé par des changements importants dans la couleur, la texture, la saveur, l'arôme et la teneur en composés biochimiques. Le déroulement de ce phénomène est coordonné par un complexe d'hormones parmi lequel l'éthylène joue un rôle déterminant. Autrement dit, étudier et comprendre le processus de l'intervention de l'éthylène (spécifiquement les récepteurs d'éthylène) sur la maturation des fruits chez les caféiers est primordial. Différentes espèces de caféiers se distinguent par leur grande variabilité dans leur cycle de fructification, le temps de maturation de leurs fruits et la teneur en différents composés déterminant la qualité à la tasse. Ces espèces constituent un matériel de choix pour étudier l'intervention des hormones, dont l'éthylène, sur l'établissement de ces différents caractères.

Le présent travail s'inscrit dans le cadre du projet scientifique de l'équipe « Génomique et qualité du café » de l'IRD, (UMR : Diversité et Génomes des Plantes Cultivées) mais aussi du projet Amélioration Génétique des Caféiers de l'INIA au Venezuela, dont l'un des buts est l'amélioration de la qualité du café. Dans ce contexte, nous aborderons dans ce travail l'étude génétique des récepteurs d'éthylène chez les caféiers avec les objectifs suivants :

Cloner et analyser la diversité génétique des gènes ETR1, ETR2 et EIN4 dans différentes espèces du genre Coffea se différenciant par la durée de leur cycle de maturation des fruits, leur synchronisation et/ou leur teneur en composés importants pour la qualité à la tasse (caféine, acides chlorogéniques, sucres....).



- Cartographier les gènes ETR1, ETR2 et EIN4 et vérifier une possible colocalisation avec un ou des QTL de la durée du cycle de fructification et/ou de teneur en composés importants pour la qualité à la tasse (caféine, acides chlorogéniques, sucres).
- Etudier l'expression de ces gènes dans les fruits matures des espèces montrant une diversité génétique interspécifique.
- Etudier le contrôle de la régulation de ces gènes
- Etudier la sur-expression de ces gènes chez des plantes modèles comme Arabidopsis thaliana, Nicotiana tabacum ou Solanum lycopersicum.
- Etudier la possible suppression de ces gènes chez des plantes modèles comme Arabidopsis thaliana, Nicotiana tabacum ou Solanum lycopersicum.
- Comprendre l'interaction des récepteurs dans la voie de signalisation de l'éthylène chez les caféiers. Leur interrelation avec d'autres voies physiologiques pendant le développement de la plante et de la maturation du fruit.



MATERIEL ET METHODES

Matériel

Matériel végétal

L'étude de la diversité des gènes de récepteurs a été conduite sur les espèces de caféiers suivantes: C. canephora (BB 62), C pseudozanguebariae (H 60), C. heterocalyx (JC 63), C. dewevrei (EB 56), C. eugenioides (DA78), C. congensis, C. sp. Moloundou (OD68), C. sessiliflora (PA65), et C. arabica var Caturra. Les plantes sont conservées en serres au centre IRD de Montpellier.

Pour la cartographie génétique des gènes de récepteurs d'éthylène, nous avons utilisé différentes populations :

- 1. Un croisement contrôlé entre PSE (parent femelle) et DEW (parent mâle) qui a été réalisé à la station de l'IRD à Man en Côte d'Ivoire (Louarn, 1992). Soixante-deux hybrides issus du rétro croisement sur DEW (BCDEW) on été obtenus par pollinisation libre de treize plantes hybrides F1 : [(PSE x DEW) x DEW] (Ky et al., 2000).
- 2. Un croisement contrôlé entre LIB x CAN qui a été réalisé à la station de l'IRD à Man en Côte d'Ivoire. Soixante-douze hybrides issus du rétro croisement avec un mélange de pollen de CAN on été obtenus: [(LIB x CAN) x CAN].
- 3. Un croisement contrôlé entre CAN x HET, réalisé à la station de 1'IRD à Man en Côte d'Ivoire. Quatre-vingt quatre hybrides de type rétro croisement on été obtenus par pollinisation avec un mélange de pollen de CAN : [(CAN x HET) x CAN] (Coulibaly et al., 2003).

L'étude de la sur-expression et de la complémentation fonctionnelle a été menée sur des plantes transformées d'Arabidopsis thaliana (écotype Columbia). Les plantes ont été cultivées dans un mélange de sol et vermiculite (1:1) jusqu'à la floraison dans une chambre de culture à 22°C avec 16 h de lumière.

Des plants de tabac (Nicotiana tabacum var. Maryland) ont aussi été utilisés pour la transformation génétique.



Les banques d'ADNc

Deux banques d'ADNc de C. canephora ont été construites, l'une (4.107 pfu/ml après amplification) à partir de jeunes feuilles et l'autre (3.5 107 pfu/ml après amplification) à partir de fruits à différents stades de développement et de maturation ; de très jeunes (petits et verts) à mûrs (gros et rouges). Elles ont été obtenues par l'utilisation du kit « Zap Express cDNA synthesis » de Stratagène (Mahesh et al., 2006).

La banque BAC

Cette banque a été réalisée au CIRAD dans un vecteur « pindigoBAC-5 - BamH1-cloning Ready » (Epicentre). à partir de C. canephora (clone 126) (Leroy et al., 2005). Elle a une couverture de 9 équivalents génomes haploïdes et est constituée de 55.296 clones avec une taille moyenne d'insert de 135 kb. Nous disposions de filtres haute densité (gracieusement fournis par le CIRAD), 3 filtres pour couvrir toute la banque, dont le transfert et la fixation sur membrane ont été faits suivant Caillieux, (2004).

Méthodes

Extraction et dosage de l'ADN total

L'extraction de l'ADN total, à partir d'environ 1 g de feuilles fraîches débarrassées de leur nervure centrale, a été réalisée grâce au kit DNeazy Plant Mini® (Qiagen). Tout d'abord, les feuilles fraîchement découpées sont broyées en présence d'azote liquide. La poudre résultante est traitée suivant les recommandations du fabricant. Les dosages sont effectués par électrophorèse sur gel d'agarose via une comparaison avec des marqueurs de concentrations connues.

Extraction et dosage de l'ARN

L'ARN total des fruits a été isolé en considérant 2 stades de développement chez CAN et 4 stades chez PSE. Les fruits ont été placés dans de l'azote liquide immédiatement après la cueillette et l'extraction d'ARN est faite suivant le protocole décrit par. Bertrand et al., (2003)



Isolement des ADN complémentaires (ADNc) pleine longueur

Les ADNc pleine longueur ont été isolés par amplification PCR à partir des banques d'ADNc précédemment décrites en suivant plusieurs étapes :

1) Cas du gène ETR1

1-1 Dessin des amorces "consensus", et obtention de fragments amplifiés spécifiques (sondes).

Pour le dessin des amorces, on a réalisé des alignements multiples de séquences d'ADNc correspondant à des gènes codant pour des récepteurs d'éthylène de différentes espèces végétales déposées dans les banques de données internationales (nr). Les couples d'amorces suivants ont été définis à partir des zones hautement conservées dans les séquences alignées.

Forward: dETR1F: 5'- GGGTXCTYRTXCARTTGGYGC-3'

Reverse: dETR1R: 5'- GGCATCCAHARXGCRCAYTC-3'

L'amplification des fragments est faite par Polymerase Chain Reaction (PCR). Ces fragments ont été clonés dans le plasmide pCR4-TOPO du kit TOPO cloning®. Après vérification que les fragments clonés correspondent bien aux gènes recherchés par séquençage et analyse Blast, ceux-ci sont utilisés comme sondes pour le criblage des banques d'ADNc.

1-2 Criblage de la banque d'ADNc

Des bactéries XL1-blue MRF résistantes à la tétracycline sont multipliées sur milieu sélectif LB contenant 12,5 µg/ml de tétracycline. Une colonie a été prélevée et placée en milieu liquide LB additionné de maltose (0,2%) et MgSO₄ (10 mM). Après une nuit sous agitation à 37°C, la culture cellulaire est centrifugée à 1000g, pendant 10 min à 4°C. Les bactéries sont resuspendues dans 10 mM MgSO₄ stérile et diluées jusqu'à une DO de 0,5 à 600 nm. Le développement des plages de lyse pour le premier criblage, est fait suivant le protocole fourni par Stratagene avec le protocole du kit ZAP Express®.

Environ 8x10⁵ plages de lyse pour chacune des deux banques ont été transférées sur des membranes de nylon Hybond N⁺ (GE Healthcare Bio-



Sciences, Piscataway, USA,). Ces membranes sont hybridées avec la sonde décrite dans le paragraphe précédent et marquée au ³²P en utilisant le kit RedPrime II (GE Healthcare Bio-Sciences).

Les plages de lyse positives après le premier criblage sont prélevées avec un cône plastique pour micropipette et resuspendues individuellement dans le tampon SM (annexe). Elles sont ensuite remises en culture individuellement sur des tapis bactériens afin de produire des plages de lyse secondaires qui seront criblées suivant la même procédure.

Les plages de lyse positives après le second criblage sont prélevées à raison de trois plages par boîte de Pétri. Le phagemide, contenu dans le génome viral est excisé en suivant le protocole donné par Stratagene (Zap Express®) puis multipliés après transfection dans des bactéries compétentes. Les phagemides qui contiennent de potentiels clones pleine longueur ont été purifiés par lyse alcaline et séquencés (MWG). Les séquences ont été analysées par Blastx sur le site NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

2) Cas du gène CcEIN4

2-1.- Dessin des amorces « consensus » et obtention des fragments amplifiés spécifiques (sondes).

Des fragments d'ADN amplifiés à partir d'ADN génomique de PSE et sur ADNc de feuille ont été clonés en utilisant des amorces dégénérées définies à partir des zones hautement conservées entre les séquences issues des bases de donnés.

Forward 5'- GGTGGAARGAHAARGTSAGRTTYG-3';

Reverse 5'-GCMARCCANGTWGCACTYTCCTTKGC-3'.

Après clonage et séquençage, une analyse Blast, montre que les fragments obtenus correspondent à différents régions d'EIN4.

2-2.- Amplification de l'ADNc

Aucun ADNc correspondant à un gène EIN4 n'a pu être isolé après criblage des banques d'ADNc, ni celle de feuille, ni celle de fruit. Cependant l'amplification sur ces mêmes banques avec des amorces dégénérées est possible. Une autre stratégie a du être définie.



Deux fragments, l'un de 362 pb à partir de l'ADN génomique de PSE, l'autre de 416 pb à partir de la banque d'ADNc de feuille, ont pu être amplifiés avec les amorces décrites dans le paragraphe précèdent. Après séquençage et confirmation par analyse blast, ces fragments ont servi au dessin de nouvelles amorces spécifiques :

EINF 5'- AGAAGCTAGTTGGCATGTCCGGAT-3',

EINR: 5'- GCAACTCGCAGCACCAAGTACTGA-3' et

EIN4L23R: 5'- CTTGGAGTGTTGCTGCTGAG-3';

Ces dernières utilisées avec les amorces universelles T3 et T7 ont permis l'amplification de fragments contenant les extrémités 5' et 3' de l'ADNc. Un contigue a été construit à l'aide du programme SeqMan (DNASTAR) avec toutes les séquences disponibles. De nouvelles amorces spécifiques ont été définies de manière à amplifier un fragment allant du codon d'initiation (ATG) au codon stop. Grâce à ces dernières amorces, un fragment couvrant la pleine longueur de la partie codante a été obtenu. Cette dernière stratégie vise à l'obtention d'un clone qui sera utilisé en transgénèse.

3) Cas du gène CcETR2

3-1 Isolement d'une séquence partielle

Un segment du gène ETR2 a été isolé à partir d'une banque soustractive d'ADNc (SSH) de C. arabica (Fernandez et al., 2004). Des amorces spécifiques ont été dessinées d'après la séquence de ce clone.

ETR2F: 5'-ACAGCAGCAATGGAGGAGGT-3',

ETR2R: 5'-GACAACCTCCTCCATTGCTGCTG -3'

Puis de manière analogue à la démarche suivie pour le gène EIN4, des fragments en 5' et 3' ont été amplifiés à partir de la banque d'ADNc de fruit en utilisant les amorces spécifiques et les amorces universelles T3 et T7.

L'extrémité 5' n'a pu être obtenue dans son intégralité à partir d'aucune des deux banques. Afin de compléter la séquence vers cette extrémité, l'approche « marche sur le chromosome » a été entreprise.



3-2. Construction d'une banque d'ADN génomique de Coffea canephora pour l'approche de « marche sur le chromosome »

Pour amplifier la région 5' du gène CcETR2, l'approche « marche sur le chromosome » a été suivie en utilisant le Kit BD GenomeWalker™ Universal, de Clontech. L'ADN génomique a été digéré par les enzymes de restriction Dra I, Eco RV, Pvu II ou Stu I. L'adaptateur d'ADN fourni dans le kit a été lié à l'ADN digéré. La première PCR a été faite en utilisant l'amorce AP1 avec une amorce spécifique reverse (GSP1):

ETR2R: 5'-GACAACCTCCTCCATTGCTGCTG-3'.

Une deuxième PCR, de type nichée, a été faite avec l'amorce AP2 et une amorce spécifique (GSP2):

GWETR2R: 5'- CAACAGCTCCTGGTTCACCATTCC-3'.

Pour aller plus en amont dans la séquence, une deuxième série de PCR a été faite en utilisant l'amorce AP1 avec l'amorce spécifique reverse (GSP1) :

ETR2PromR 5'- AATCCATTATCAGCAGCTGAGAGAGA -3'.

La deuxième PCR a été faite avec l'amorce AP2 et la même amorce spécifique (GSP1). Les conditions utilisées pour la première PCR ont été les suivantes:

-7 cycles de 25 sec à 94° C et 3 minutes à 72° C, suivi par 32 cycles de 25 sec à 94° C et 3 minutes à 67° C, terminé par une extension finale de 7 minutes à 67° C.

La deuxième PCR a été faite de la manière suivante :

-5 cycles de 25 sec à 94° C et 3 minutes à 72° C, suivi par 20 cycles de 25 sec à 94° C, et 3 minutes à 67° C avec une extension finale de 7 minutes à 67° C.

Après migration sur gel d'agarose à 1% et coloration au bromure d'éthidium, les fragments les plus longs résultants de la PCR nichée ont été clonés dans le vecteur pCR4-TOPO. Après séquençage ces fragments ont servi à assembler une séquence pleine longueur à l'aide du logiciel SegMaq (DNASTAR).

3.2.- Amplification de l'ADNc

La séquence assemblée précédemment a permis de dessiner des amorces spécifiques de manière à amplifier la séquence codante allant du triplet ATG jusqu'au codon stop. L'amplification a été réalisée en utilisant comme matrice



l'ADNc monocaténaire préparé pour l'analyse par RT-PCR à partir de fruit de C. canephora au deuxième stade de développement.

Etude de l'organisation des gènes

Amplification des gènes pleine longueur

Des amorces spécifiques ont été dessinées sur la base de la séquence des ADNc de manière à amplifier la séquence génomique correspondant à chaque gène de récepteur d'éthylène. En utilisant l'ADN génomique de CAN comme matrice, on a pu amplifier par PCR les parties non codantes de chaque gène et déterminer la structure de chacun d'entre eux. Pour ETR1, la séquence génomique a été amplifiée en utilisant l'ADN génomique de CAN PSE et DEW comme matrice.

Isolement de la région promotrice du gène CcEIN4

La région promotrice du gène CcEIN4 a été amplifiée en appliquant la méthodologie « marche sur chromosome » sur un clone BAC identifié comme contenant ce gène. Cette « marche » a été réalisée avec le kit BD GenomeWalkerTM Universal, (Clontech). Après digestion du clone BAC par l'enzyme Dra I, un adaptateur a été lié à l'ADN digéré. Pour la suite, nous avons suivi un protocole similaire à celui utilisé pour l'amplification de CcETR2. Les fragments amplifiés les plus longs ont été clonés dans le vecteur pGMT easy (PROMEGA). Après séquençage ces fragments ont servi à assembler une séquence à l'aide du logiciel SegMaq (DNASTAR).

Etude de la diversité génétique dans sept espèces de Coffea

Pour mener cette étude nous avons utilisé les séquences introniques : le cinquième intron du gène ETR1 et l'unique intron dans EIN4 sont très variables selon les espèces. Ces séquences ont été utilisées pour étudier la diversité intra et inter spécifique par amplifification à partir de l'ADN génomique de CAN, PSE, DEW, HET, ARA, EUG et LIB en utilisant les amorces dessinées à partir des séquences génomiques de CAN:



• Gène ETR1 :

F5IETRF:5'-GTCTTATATGGCATTCGGTAAGAA-3'

5IETRR: 5'- TCAAGGATAACAACAGGGGTAGAC-3'.

• Gène EIN4:

F3PEIN4F:5'-CTTCTCTGATTGCTCAAGGCCA-3'

3PEIN4R: 5'- TCTTGCACTATGGAGTACGAC -3'.

Ces amorces se situent dans les exons 5 et 6 en bordure de l'intron 5 de manière à être suffisamment similaires à toutes les séquences des espèces étudiées.

Après amplification à partir des ADN génomiques des différents génotypes mentionnés, on procède à leur clonage, séquençage et analyse.

Pour l'étude de la ségrégation, on rajoute en 5' de l'amorce F la séquence M13 (CACGACGTTGTAAAACGAC) marqué par un fluorocrome IR700 ou IR800. Après amplification, les produits PCR sont visualisés avec un séquenceur automatique « IR2 DNA sequencer » (LI-COR, model 4200L-2, Lincoln, Nebr.) qui permet de détecter des fluorescences émises à des longueurs d'onde de 700 et 800 nm (Poncet et al., 2004).

Les différences de taille entre fragments amplifiés ont permis d'observer la ségrégation des allèles parentaux dans des populations issues de rétrocroisements interspécifiques : [(PSE X DEW) x DEW], [(CAN x HET) x CAN], [(LIB x CAN) x CAN].

Dosage Biochimique et étude agronomique

La mesure des teneurs en caféine et les données agronomiques ont été évaluées dans la population [(PSE X DEW) x DEW]. Les analyses par HPLC et les évaluations phénotypiques ont été décrites par Barre et al., (1998); Ky et al., (1999); Akaffou et al., (2003).

Nombre de copies du gène CcETR1

10 μg d'ADN génomique de CAN, ou DEW ont été digérés par les enzymes de restriction Eco RV et Dra I. D'après les données de séquences obtenues, nous savons que 3 sites Eco RV et 2 sites Dra I sont présents dans la séquence que nous avons établie, mais aucun de ces sites n'est situé dans



la zone située entre les amorces définies. Les ADN digérés sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8 %. Pour la suite de l'expérimentation nous avons suivi le protocole décrit par (Sambrook et Russell, 2001), avec les modifications suivantes :

- Après migration, colorer le gel au BET, vérifier la migration sous UV.
- Tremper le gel dans HCL 0,25M pendant 20 minutes (dépurination).
- Rincer le gel à l'eau Milli Q.
- Tremper le gel dans NaOH 0,4N pendant 15 minutes (dénaturation).
- Transférer l'ADN pendant 24h sur membrane de nylon HYBOND
 N+ (Amersham pharmacia biotech, England), en utilisant NaOH
 0,4N comme solution de transfert (transfert alcalin).
- Faire sécher la membrane entre 2 feuilles de papier Whatman.
- Fixer L'ADN sous UV dans un « spectro linker », program Optimal crosslinker : 120 mJ.cm⁻².
- Avant la première utilisation, tremper la membrane dans du SSC2X pendant 15 min à température ambiante.

Hybridation des membranes

Après fixation de l'ADN sur la membrane, celle-ci est placée dans un tube d'hybridation pour procéder à la pré-hybridation pendant au moins 3h à 65° C avec 20 mL de la solution suivante :

Denhardt 5X, SSC 6X, SDS 0,5%, ADN de sperme de hareng 0,1mg/ml.

La solution de pré-hybridation est chauffée (sans l'ADN de sperme de hareng) 10 min à 65° C. l'ADN de sperme de hareng est dénaturé par incubation 5 min. à 100° C puis refroidissement brusque dans la glace avant d'être ajouté à la solution de pré-hybridation.

La sonde est préparée par PCR à partir de l'ADN génomique de CAN. Elle couvre le dernier exon qui correspond à la région la plus variable, et donc la plus spécifique, des gènes de récepteurs d'éthylène. La sonde a été amplifiée en utilisant les amorces suivantes :



IETRcF 5'- CCCCTTATCCATGGCTGATTG -3'

IETRcR 5'-CATGATTTACAGGGGCTCTGG -3'

Le marquage de la sonde au dAT³²P et dCT³²P est réalisé à l'aide du kit « Prime a gene » de Promega en suivant le protocole du fournisseur. Après dénaturation, la sonde est ajoutée à 20 mL de solution d'hybridation, qui a la même composition que celle de pré-hybridation.

L'hybridation se déroule à 65° C pendant toute la nuit. Les membranes sont ensuite lavées dans des solutions de rinçage de stringence croissante:

- ➤ SSC 2X, SDS 0,5%, rinçage par agitation rapide à température ambiante (deux fois)
- SSC 0,5X, SDS 0,2% pendant 10 min à 60 ° C (deux fois)
- ➤ Le nombre de coups par minutes (CPM) est vérifié et si nécessaire on rajoute un quatrième lavage :

SSC 0,2X, SDS 0,2% pendant 10 min à 60° C.

Pour la révélation, les membranes sont mises au contact d'un film d'autoradiographie (Kodak BioMax Film) dans une cassette et placée à -80 °C pendant trois jours après lesquels on procède à la révélation.

Criblage de la banque BAC

L'intégralité de la banque BAC, répartie sur 3 filtres à haute densité, a été hybridée avec une sonde spécifique pour chaque gène, suivant le protocole suivant :

Les membranes sont déposées dans un tube contenant 50 mL de solution de pré-hybridation (50 mM Tris, 10 mM EDTA, 5X SSC, 1X Denhardt; 0,2 %SDS; 100µg.mL-1ADN de sperme de saumon). La membrane est pré- hybridée au moins 3 h à 65° C.

La solution de pré-hybridation est ensuite remplacée par 50 mL de solution d'hybridation (identique à la solution de pré-hybridation plus 1 g .mL-1 dextran sulfate) plus la sonde marquée. L'hybridation se déroule pendant 16 heures à 65° C.

Les membranes sont rincées avec 50 mL de la solution de lavage 1 (2X SSC, 0,5 % SDS) en agitation rapide dans le tube à température ambiante. Elles sont ensuite incubées 20 minutes avec 50mL de la solution de lavage 2 (0,5 X SSC, 0,1% SDS) préalablement chauffée à 65° C puis 20 minutes avec



la solution de lavage 3 (SSC 0,1X; SDS 0,1 %) préalablement chauffée à 65°C. La révélation est effectuée par autoradiographie sur film (LifeRayTM, Medical Imaging Film. Ferrania, Italy).

Les spots doubles, observables sur les films, sont comptés pour évaluer le nombre de clones portant la séquence d'intérêt dans la banque. Ils sont ensuite localisés pour identifier les coordonnées des clones dans la banque ordonnée. Pour cela, une grille de lecture est superposée au film. L'orientation des spots doubles permet de définir le numéro de la plaque (coordonnée Z). La position sur le film (X,Y) donne les coordonnées du puit dans cette plaque

Préparation et marquage des sondes

Les sondes sont préparées par PCR sur l'ADN génomique de CAN. Pour le criblage de la banque pour le gène CcETR1 la sonde utilisée est la même que celle utilisée pour le Southern blot.

Pour le gène CcEIN4, la sonde a été amplifie avec les amorces suivantes: SEIN4F 5'- GCCCTTGCGATTAATGAACCAG-3'

SEIN4R 5'-AGGCACAAGCACTTAACCAAACAA -3'.

Pour le gène CcETR2, la sonde utilisée pour le criblage de la banque BAC, est amplifiée par PCR à partir d'un fragment d'ADNc préalablement cloné. La sonde longue de 500 pb est obtenue grâce aux amorces : M13F et ETR2aR : CCGGTGATACCGTTGAACGCATGCTCTC. Comme pour les autres sondes, le marquage de celle-ci au dAT³²P est réalisé à l'aide du kit « Prime a gene » de Promega en suivant le protocole du fournisseur.

Etude de l'expression des gènes

Des RT-PCR ont été effectuées à partir d'ARN totaux de fruits de C. pseudozanguebariae récoltés à quatre stades de maturation et désignés respectivement PG1, PG2, PG3 et PG4 (40%, 60%, 80% et 100% du temps de fructification (Bertrand et al., 2003). Chez C. canephora nous ne disposions que de deux stades de maturation (CG1 et CG2, 40 et 80%).

Le premier brin d'ADNc est synthétisé grâce au kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) selon le protocole défini par



Tableau 2. Oligonucléotides synthétiques utilisés pour la RT-PCR semi quantitative de différents récepteurs d'éthylène et facteurs de transcription chez CAN et PSE.

Gène	Amorce	Séquence	Température	Taille
			d'hybridation	attendue
			°C	pb
ETR2	IETR2-F	GAGTCAGGCAAGCAATCAAGGATG	56	399
	IETR2-R	CCTATGCATGTCATCGTCATCAGC		
ETR1	IETRd-F	GTCCAGAGCCCCTGTAAATC	56	708
	IETRe-R	CAAAGCAGAATTATACTACACCATG		
EIN4	EINTRON-F	GGCAAGCCAGGCAAGGAACT	56	703
	EINTRON-R	GGCCCGAGAATCAGAGGACAT		
ERF2	ERF-F1	GGGGGATCAGGCAGCGACC	54	580
	ERF-R1	CATGAAGGACTCATAGGCCAGC		



le fournisseur. La PCR est réalisée dans un volume de 50μL à partir de 2 μL d'ADNc. Une même réaction de transcription reverse peut donc servir pour tester l'expression de différents gènes en utilisant différentes couples d'amorces spécifiques. Il a été possible de la sorte d'amplifier des segments pour chaque gène et ce à chaque stade de maturation des fruits (tableau 2). Les conditions de PCR ont été les suivantes : 4 min à 94° C, 25-31 cycles comprenant : 40 sec à 94° C, 1 min à une température particulière pour chaque paire d'amorces, 1 min à 72° C ; 7 min à 72° C et 10 min à 4° C. Comme contrôle positif, un fragment de 400 pb. a été amplifié en utilisant des amorces spécifiques du gène de l'actine: 5'-GCAGATGGTGAGGAGATTCAA-3' et 5'-GTCCAGCACAATACCAGTTGTACG-3'. Les prélèvements ont été effectués chaque 3 cycles à partir du 25ème. Les fragments d'ADN amplifiés ont été séparés par électrophorèse dans un gel d'agarose à 1,5% à 100 V pendant 30 minutes.

Isolement et analyse in silico des régions promotrices de CcEIN4 et de CcERF1

L'approche « marche sur le chromosome » a été exécutée en utilisant le BD GenomeWalkerTM Universal Kit (Clontech Palo Alto, CA, USA) pour isoler la région située en amont de la partie transcrite de CcEIN4. Cette « marche » a été conduite sur un clone BAC préalablement identifié et digéré par les enzymes de restriction Dra I ou Eco RV.

Pour CcEIN4, une seule amorce spécifique a été utilisée :

5'-GGCTGACACGCTGAAGATCATAACTGC-3'.

Des données de séquences partielles nous ont montré que le BAC qui contenait le gène EIN4 contenait également un gène codant pour le facteur de transcription ERF1. Il nous a paru intéressant, disposant du matériel prêt pour cela, de prolonger l'étude au promoteur de ce gène.

Pour CcERF1, les amorces spécifiques utilisées pour la PCR nichée sont les suivantes :

GSP1: 5'-TGATGACGCCAAGGACAAGAAGAAGATG-3'



GSP2: 5'- CCATACTGCATCTGCTTCAACGACTC-3'.

Les séquences promotrices ont été analysées in silico et les éléments régulateurs putatifs ont été identifiés grâce à la base de données « Plant cisacting regulatory DNA elements (PLACE) :

(http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html) (Higo et al., 1999).

Construction des vecteurs d'expression et transformation génétique

L'ADNc pleine longueur des récepteurs d'éthylène CcETR1, CcETR2 et CcEIN4 et ceux des facteurs de transcription de type ERF (Ethylene Response Factor : CcEFR1 et CcERF2) isolés, ont été clonés dans des vecteurs binaires pour la transformation d'Arabidopsis thaliana et Nicotiana tabacum

ETR1

Des amorces spécifiques ont été dessinées à partir de l'ADNc pleine longueur d'CcETR1 isolé à partir de la banque d'ADNc (CcETR1-1a3). Afin d'en faciliter le sous clonage, des sites de restriction ont été intégrés dans la séquence des amorces; le site Hind III dans l'amorce sens et Bam HI dans l'amorce anti-sens pour le sous-clonage en orientation sens. Pour les constructions en orientation anti-sens, les sites de restriction ont été inversés dans les amorces.

Clonage sens:

Amorce sens: 5'-CGCAAGCTTATGGAGTCCTGTAACTGCAAAG-3'

Amorce anti-sens: 5'- CGCGGATCCTTATTGAGCCTCCAGCAGAAC-3.

Clonage antisens:

Les sites de restriction (en gras) sont inversés.

Les produits de PCR obtenus ont été clonés dans le vecteur pCR4-TOPO pour donner le plasmide pCcETR1.

Après digestion de pCcETR1 par Bam HI et Hind III, le fragment correspondant à été ligué dans pCAMBIA 1300, dans lequel on a ajouté le promoteur 35S du CaMV et le terminateur du même virus à partir du vecteur pA4T23. Ce nouveau vecteur a été digéré par les mêmes enzymes. Le fragment contenant l'ORF de CcETR1 a été inclus en orientation sens et anti-sens pour



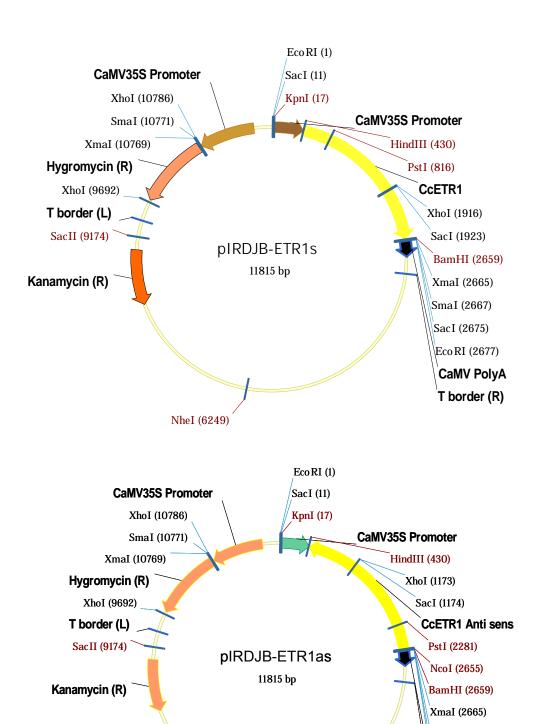


Figure 14. Vecteur d'expression du gène CcETR1 en orientation sens et anti sens

NheI (6249)



SmaI (2667)
SacI (2675)
Eco RI (2677)
CaMV PolyA

T border (R)

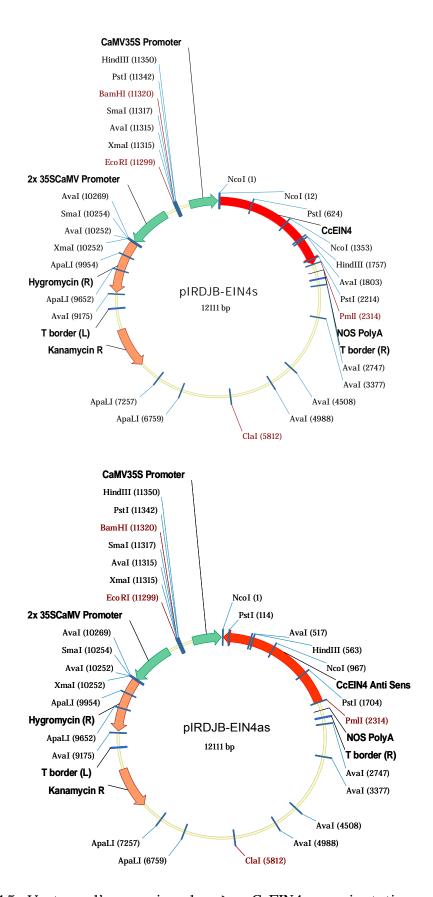


Figure 15. Vecteur d'expression du gène CcEIN4 en orientation sens et anti sens



donner les vecteurs pIRDJB-ETR1s et pIRDJB-ETR1as, respectivement. (Figure 14)

EIN4

L'ADNc pleine longueur de CcEIN4 cloné dans pCR4-TOPO (pCcEIN4/C18) a été amplifié en utilisant des amorces spécifiques dans lesquelles ont été inclus les sites de restriction de Bam HI pour l'amorce sens et de Sma I pour l'amorce anti-sens.

Clonage sens:

Amorce sens: 5'-CGCGGATCCATGGTTCAAGATTAAGGGAT-3'

Amorce antisens: 5'- CGCCCCGGGTCAAAAACCATCACCTGCTCG-3

Clonage anti-sens:

Les sites de restriction (en gras) sont inversés.

Les fragments obtenus ont été clonés dans pCR4-TOPO. Cet ADNc a été placé, en orientation sens et anti-sens sous le contrôle du promoteur 35S du CaMV dans le vecteur pCAMBIA 1305.1 après digestion par les enzymes Bgl II et Pml I. Ceci permet de substituer le gène uidA (gus) porté par ce vecteur par le fragment désiré. Les vecteurs obtenus, nommés pIRDJB-ETR1s et pIRDJB-ETR1as, contiennent respectivement l'ADNc de CcEIN4 en orientation sens et anti-sens. (Figure 15)

ETR2

L'ADNc pleine longueur de CcETR2 cloné dans pCR4-TOPO (pCcETR2/2) a été amplifié en utilisant des amorces spécifiques contenant en plus les sites de restriction Hind III pour l'amorce sens et Xba I pour l'amorce antisens.

Clonage sens:

Amorce sens: 5'- CGGAAGCTTATGTTTAGGAGATTAGCATCTGGGC -3'

Amorce antisens: 5'-CGGTCTAGACTATGGAACTCTGCTTGCATGTAGC - 3

Le produit PCR obtenu a été cloné dans le vecteur pCR4-TOPO pour donner le plasmide pCcETR2.

Après digestion de pCcETR2 par Hind III et Xba I, le fragment correspondant à été ligué dans pCAMBIA 1300, dans lequel on a ajouté le promoteur 35S du CaMV et le terminateur du même virus à partir du vecteur pA4T23. Ce nouveau vecteur a été digéré par les mêmes enzymes. Le fragment



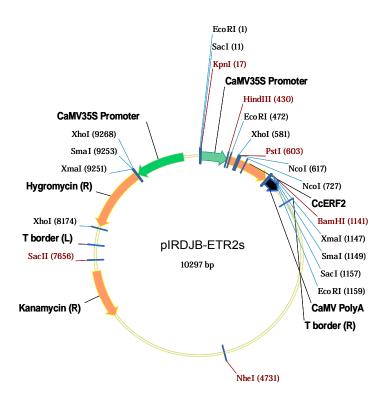


Figure 16. Vecteur d'expression du gène CcETR2 en orientation sens



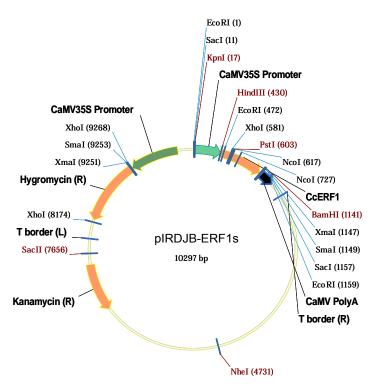


Figure 17 Vecteur d'expression du gène CcERF1 en orientation sens

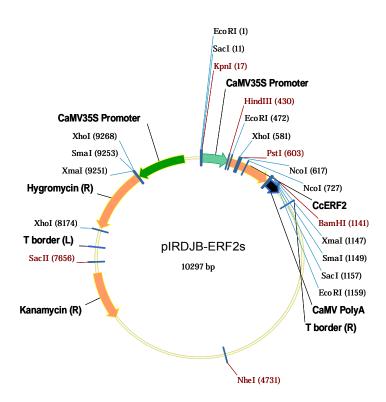


Figure 18. Vecteur d'expression du gène CcERF2 en orientation sens



contenant l'ORF d'ETR2 a été inclus en orientation sens pour donner les vecteurs pIRDJB-ETR2s. (Figure 16)

ERF1

L'ADN génomique qui contient le gène CcERF1 pleine longueur a été isolé à partir du même clone BAC que celui dans lequel se trouve le gène CcEIN4. Ce gène de contient pas d'intron, il a été amplifié en utilisant des amorces spécifiques contenant en plus les sites de restriction Hind III pour l'amorce sens et Bam HI pour l'amorce anti-sens.

Clonage sens:

Amorce sens: 5'- CGGAAGCTTATGGATTATTCATCATCTTCCGCAG -3'

Amorce antisens: 5'-CGCGGATCCTCATTGATGACGCCAAGGACAAG -3

L'amplicon obtenu a été cloné dans le vecteur pGMT (plasmide pCcERF1). Pour construire le vecteur d'expression portant le gène de CcERF1 on a utilisé comme ossature le même vecteur pCAMBIA 1300 utilisé par le clonage de l'ADNc de CcETR1. (Figure 17)

Il n'y a pas eu de clonage en orientation anti-sens réalisé pour ce gène.

ERF2

L'ADNc pleine longueur d'ERF2, isolé de la banque d'ADNc de fruits (CcERF-8b1), a été amplifié en utilisant des amorces spécifiques contenant en plus les sites de restriction Hind III pour l'amorce sens et Bam HI pour l'amorce anti-sens.

Clonage sens:

Amorce sens: 5'- CGGAAGCTTATGTGTGGCGGTGCAATCCTCG -3'

Amorce anti-sens: 5'- CGCGGATCCTTACAGAGGCATTGGGCGATTGG - 3

Pour construire le vecteur d'expression portant l'ADNc d'ERF2 on a suivi le même procédé que pour ETR1 avec le même vecteur pCAMBIA 1300 comme ossature ; (Figure 18).

De même que pour ERF1, la construction en orientation anti-sens n'a pas été faite.



Transformation génétique

Multiplication des vecteurs binaires

Les différents vecteurs binaires devant servir à la transformation génétique, ont été tout d'abord transféctés dans Escherichia coli pour multiplication en suivant le protocole habituel. La présence des vecteurs binaires est contrôlée par PCR à l'aide des amorces ayant servi à cloner les ADNc correspondants

Transformation d'Agrobacterium tumefaciens par électroporation

 $2~\mu L$ de solution diluée de plasmide sont ajoutés à 100 μL de cellules compétentes d'A. tumefaciens (souche GV3101) dans un tube Eppendorf maintenu au froid. Le mélange est laissé pendant 2 min dans la glace puis transféré dans une cuvette à éléctroporation de 0,2 cm. La solution est soumise à une décharge électrique de 2500 V, 200 Ω de résistance et 25 μFD de capacitance. Après la décharge, 500 μL de LB sont ajoutés. Le mélange est incubé pendant 2h à 28°C. La culture bactérienne est étalée sur boîte de Pétri contenant du LB additionné de kanamycine (50 $\mu g.mL^{-1}$) et rifampicine (25 $\mu g.mL^{-1}$) pour sélectionner les transformants.

Transformation d'Arabidopsis thaliana

Des plantes d'Arabidopsis sont cultivées jusqu'à l'apparition de nombreux bourgeons floraux. Ces plantes sont ensuite transformées à l'aide d'A. tumefaciens selon la méthode du « floral dip » (Clough et Bent, 1998). Après trempage dans la solution d'A. tumefaciens, les plantes sont laissées dans des conditions de haute humidité pendant une journée, puis transférées dans des conditions normales jusqu'à la production de graines T0. Ces graines T0 sont désinfectées avec une solution de « Domestos » (Lever Fabargé, Paris, France) dilué au 1/5ème suivi de trois lavages à l'eau stérile. La germination de ces graines est faite en boîtes de Pétri contenant du milieu MS additionné de 100 mg.L-1 de Cephotaxine et 50 mg.L-1 d'Hygromycine ou 50 mg.L-1 de Kanamycine suivant la construction. Les plantes transformées T1 sont transférées au bout de 2 à 3 semaines dans des conditions standard de culture jusqu'à l'obtention de graines T1.



Transformation de Nicotiana tabacum

Des feuilles prélevées sur des plantes de 2 mois sont désinfectées avec une solution d'hypochlorite de sodium (2,4%) et coupées en fragments d'approximativement 1 cm². Ces fragments sont mis en contact pendant 15 min avec une solution à une densité optique (DO) de 1 d'A. tumefaciens contenant la construction d'intérêt et additionnée de 100 µM d'acetocyringone. Les explants sont séchés sous hotte et placés en boîtes de Pétri contenant du milieu TIR : MS plus vitamines (Thiamine 10 mg.L-¹; Acide nicotinique 1 mg.L-¹; Pyridoxine 1 mg.L-¹), additionné de 1 mg.L-¹ BAP et 0,1 mg.L-¹ NAA). Les co-cultures son incubées pendant 5 jours à 28° C à l'obscurité. Les explants sont alors lavés avec une solution de cephotaxine 100 mg.L-¹, rincés deux fois avec de l'eau stérile, séchés et placés dans de nouvelles boîtes de Pétri avec le même milieu TIR additionné de 500 mg.L-¹ de Cephotaxine et 50 mg.L-¹ d'Hygromicine ou 75 mg.L-¹ Kanamycine suivant la construction.

Les explants sont repiqués toutes les deux semaines sur ce même milieu. Quand des pousses apparaissent et mesurent environ 2 cm de longueur, elles sont placées isolément sur du milieu RM : MS plus vitamines, additionné de IBA 1 mg.mL-1; 200 mg.L-1 de Cephotaxine et 25 mg.L-1 d'Hygromicine ou 50 mg.L-1 Kanamycine (selon la construction) jusqu'à la croissance de racines. Les plantes avec des racines bien développées sont transplantées en terre et transférées dans une serre S2 jusqu'à l'obtention de graines.

RESULTAT

A. Etude du gène ETR1

Dans cette partie, on s'attachera à présenter les résultats obtenus pour l'étude du gène ETR1. La majeur partie de ceux-ci sont déjà décrits dans l'article : « Molecular Characterisation of an Ethylene Receptor gene (CcETR1) in coffee trees. Its relationship with fruit development and caffeine content », soumis à la revue Molecular Genetics and Genomics.

Isolement des séquences pleine longueur correspondant aux parties codantes des gènes

Un fragment d'ADN génomique de PSE a été amplifié à l'aide d'amorces dégénérées définies après alignement de séquences de gène ETR1 présentes dans GeneBank. Ce produit d'amplification PCR a été cloné puis séquencé. Après vérification de son homologie à l'aide d'alignement Blastx, il a été montré qu'il correspondait bien à un segment d'un gène ETR1. Ce fragment a été utilisé comme sonde pour cribler des banques d'ADNc de C. canephora construites à partir de jeunes feuilles ou de fruits à différents stades de développement ou de maturation.

Après deux séries successives de criblage, cinq clones positifs ont été sélectionnés. L'analyse par PCR en utilisant des amorces universelles a montré qu'ils étaient de même taille. L'un d'eux a été entièrement séquencé. Il mesure 2649 pb. avec une ORF putative de 2223 pb. Le polypeptide prédit comporte 740 acides aminés, sa masse moléculaire est de 82,48 kDa. La séquence en acides aminés est à 87,1% identique à celle de l'ADNc ETR1 de Petunia x hybrida, Le segment N-terminal (les premiers 300 acides aminés) est très conservé: 97,4% de similarité avec celui de Prunus persica.

2) Etude de l'organisation de gène

Grâce à des amorces spécifiques le gène ETR1 a été amplifié chez différentes espèces de caféiers (CAN, PSE et DEW). Ce gène a cinq introns dans la région codante. Le dernier intron est de taille différente chez les espèces étudiées. Grâce à cette différence, on a étudié sa ségrégation dans



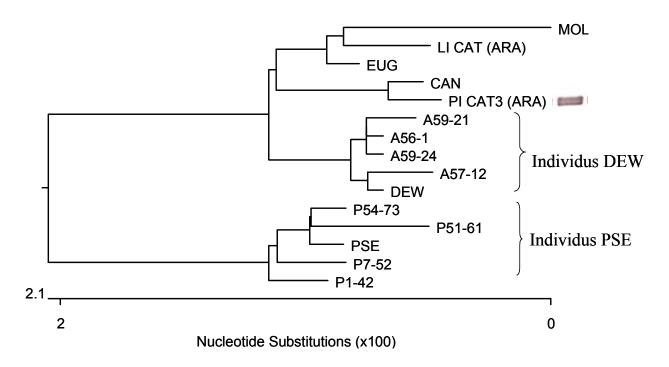


Figure 19. Arbre phylogénétique construit sur la base de la diversité du 5ème intron du gène ETR1 analysé chez PSE, DEW, CAN et ARA. PI CAT3 (ARA) correspond au segment de petite taille chez ARA. LI CAT correspond au segment plus grand chez ARA.



différentes populations : [(PSE \times DEW) \times DEW] ; [(CAN \times HET) \times CAN] ; [(LIB \times CAN) \times CAN].

L'analyse faite par Southern blot indique la présence d'une copie unique de ce gène dans le génome de CAN et de DEW. L'hybridation de la banque BAC (Leroy et al., 2005), qui a une couverture équivalente à 9 génomes, avec une sonde spécifique, montre 7 spots ce qui confirme le résultat du Southern. En conclusion on peut dire qu'il n'existe qu'une seule copie du gène ETR1 dans les génomes de CAN et DEW.

Amplification du region 5' du gène ETR1

En comparant la séquence d'ADNc pleine longueur avec la séquence génomique comprenant plus de 2000 pb. en amont de l'ORF, il a été établi ; qu'en plus des 5 introns dans la région codante, la région 5'UTR de cet ADNc contient une petite phase de lecture pouvant potentiellement coder 36 acides aminés. Ce cadre de lecture contient lui-même un intron de 978 pb. Le produit susceptible d'être codé par cette petite phase de lecture ne présente aucune homologie avec des séquences polypeptidiques déposées dans les banques de données. Nous n'avons pas recherché si ce produit était effectivement synthétisé et accumulé dans la plante.

3) Etude de la diversité génétique dans espèces du genre Coffea

Nous avons étudié la variabilité intra (cinq individus PSE et cinq individus DEW) et inter-spécifique de ce gène chez les espèces étudiées dans le cadre de cette thèse. Au niveau du 5ème intron, l'espèce C. arabica var Caturra (ARA) présente deux bandes (espèce tétraploïde), Le segment de petite taille a une séquence identique à 99,5% à celle de CAN, par contre, le plus grand est à 99,3% identique à celui de C. eugenioides, et 98,8% identique à celui de C. moloundou et seulement 90,9% à celle de CAN. Ce résultat va dans le sens de la confirmation que CAN est un de parent d'ARA, par contre, l'autre ne peut être clairement différencié par cette séquence mais l'hypothèse que cela soit C. eugenoides reste la plus probable. La figure 19 montre l'arbre phylogénétique des différentes espèces de Coffea établi après alignement de cette séquence.



Tableau 3. Effets d'ETR1 sur quelques caractères quantitatifs dans la descendance d'un back-cross interspécifique. DD et PD : valeur moyenne pour les individus, homozygote (DEW/DEW) et hétérozygote (PSE /DEW) respectivement. %PSE : réduction présentée par les individus hétérozygotes possédant l'allèle PSE

Caractère	DD	DP	%PSE	g.l	F	р
Durée, en jours, du cycle de fructification de fruits (DCF)	279.8 ± 7.066	252.3 ± 5.893	9,8 %	1/37	8.881	0.00507
Durée, en jours, de maturation de l'albumen (DN)	125.1 ± 4.756	107.1 ± 3.967	16,4 %	1/37	13.682	0,00605
Teneur en Caféine	0.6532 ± 0.0399	0.4921 ± 0.0369	24,7 %	1/48	8.764	0,00476
Pd. en g de 100 grains (P100).	10.247 ± 0.362	9.064 ± 0.341	11.5%	1/49	5.641	0.021
Teneur en 3CQA	0.3171 ± 0.0122	0.2746 ± 0.012	13.4%	1/47	6.1023	0.0171
Teneur en 3,5 DiCQA	0.6532 ± 0.0399	0.4921 ± 0.0369	24.7%	1/48	8.7636	0.00476



L'analyse du polymorphisme allélique du gène ETR1 dans la descendance du back- cross [(PSE x DEW) x DEW] a montré la ségrégation attendue 1:1 pour un seul locus. L'analyse de quelques caractères de cette même descendance a montré que le gène ETR1 semble lié avec leur variation. Ces caractères sont :

- La durée du cycle de fructification
- La durée de maturation de l'albumen
- Le poids de 100 grains (P100).
- La teneur en caféine.
- La teneur en deux isomères d'acides hydroxycinnamiques (HQA).

La présence de l'allèle PSE (P) dans une plante de la descendance hétérozygote pour ce gène, s'accompagne d'une réduction significative du poids des grains et d'une réduction de 27 jours du cycle de fructification. Cette réduction est expliquée à 77% par la réduction de la durée de maturation de l'albumen. Chez les individus hétérozygotes PSE-DEW (PD), la maturation de l'albumen se produit en moyenne 18 jours avant les individus homozygotes DEW-DEW (DD). Les individus hétérozygotes montrent également une réduction de 24,7% de la teneur en caféine, de 13,4% de la teneur en 3CQA et 24,7% en 3,5 DiCQA dans leurs grains (Tableau 3). Cette relation entre la durée du cycle de fructification, la durée de la maturation de l'albumen et les teneurs en caféine et de deux isomères des HQA pourrait indiquer une forte accumulation de cet alcaloïde et de ces acides pendant la maturation de l'albumen. Cette hypothèse doit être confirmée.

Les études de ségrégation dans les populations issues de différents back-cross, BCDEW, BCHET, BCLIB, montre que dans chacun d'entre eux les allèles ETR1 ségrégent suivant les proportions attendues pour un seul locus 1:1. Il n'a pas été observé de distorsion de ségrégation. Malheureusement, la taille de la population en ségrégation issue du back-cross BCDEW n'est pas suffisante et le nombre de marqueurs moléculaires qui y ont été positionnés pas assez important, pour que l'on ait pu y cartographier avec précision ETR1. Il n'a donc pas été possible de trouver une colocalisation avec les QTL identifiés sur cette carte qui concernent en particulier les caractères pour lesquels nous avons établi une relation. Dans la descendance BCHET, il a été

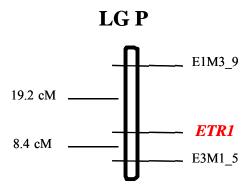


Figure 20. Localisation du gène ETR1 sur la carte génétique établie avec la descendance du back-cross (CAN x HET) x CAN

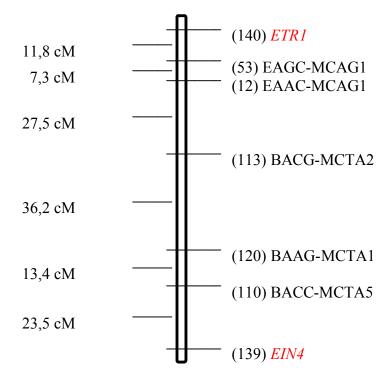


Figure 21. Localisation du gène ETR1 sur le groupe de liaison H de la carte génétique établie sur la descendance du back-cross (LIB x CAN) x CAN.



trouvé une liaison avec 2 marqueurs microsatellites (SSR) mais l'ensemble de ces trois locus na pu être rattaché à un groupe de liaison défini (figure 20). Ce n'est que sur la carte génétique élaborée à partir de la population issue du backcross BCLIB qu'ETR1 a pu être placé sur le groupe de liaison 2 qui contient également le gène EIN4 (figure 21).



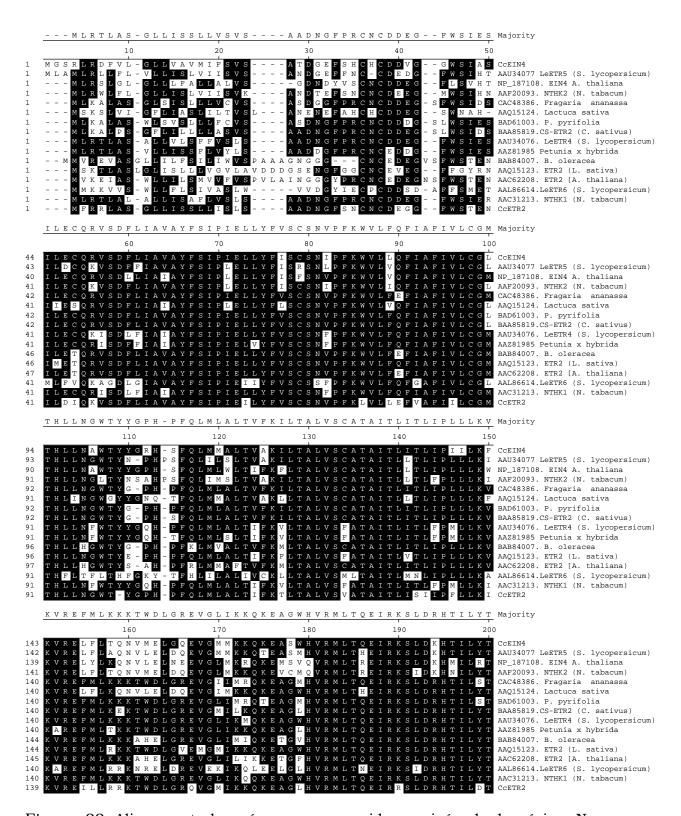


Figure 22 Alignement des séquences en acides aminés de la région Nterminale des récepteurs d'éthylène du type EIN4 et ETR2 où l'on distingue la qualité de l'alignement de cette région conservée.



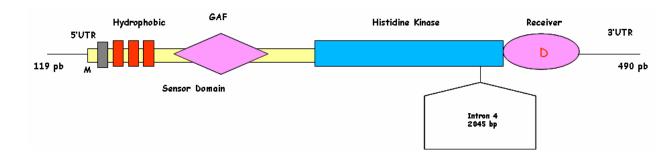


Figure 23. Structure du gène EIN4 chez C. canephora en relation avec la structure de la protéine codée.

: Peptide signal putatif qui dirigerait la protéine vers la voie de sécrétion. Sensor domain : domaine senseur subdivisé en :
: domaine trans-membranaire et GAF : domaine conservé mais de rôle inconnu; Histidine Kinase : domaine Histidine Kinase, ce domaine est interrompu par un long intron de phase 0; Receiver : domaine de réponse, possède le site conservé de phosphorylation aspartate (D)



B. Etude du gène EIN4

Les récepteurs de type EIN4 appartiennent à la deuxième sous-famille des récepteurs d'éthylène. Ils se différencient de ceux de type ETR1 par leurs trois domaines transmembranaires, un peptide signal putatif qui dirigerait la protéine vers la voie de sécrétion et une zone dégénérée de l'histidine-kinase. Chez la tomate, les membres de cette sous-famille sont plus exprimés pendant la maturation du fruit, et lors de la réponse aux attaques de pathogènes.

A l'aide d'amorces dégénérées, un gène EIN4 a été préalablement identifié chez les caféiers à partir d'ADN génomique de PSE et sur de l'ADNc dérivé de feuilles de CAN. Ces premiers fragments ont permis le dessin d'amorces spécifiques. Un ADNc, supposé être pleine longueur, d'EIN4 a été isolé à partir de la banque d'ADNc de fruits de C. canephora. Il a une longueur de 2906 pb, et contient une ORF putative de 2298 pb. La séquence codante (cds) de CcEIN4 est à 35,3% similaire à celle de CcETR1. Le segment 5'-terminal, qui correspond aux domaines transmembranaires, est le plus conservé. Il a 85,7% d'identité avec LeETR5 de S. lycopersicum. Le polypeptide prédit contient 765 acides aminés, sa masse moléculaire est de 85,63 kDa. La séquence en acides aminés est à 74,4% identique à celle du produit du gène LeETR5 de S. lycopersicum; à 70,5% identique à NTHK2 de N. tabacum et à 60,8% identique à AtEIN4 d'A. thaliana. La figure 22 montre la comparaison des séquences en acides aminés de cette protéine putative avec des orthologues où l'on distingue la qualité de l'alignement de la région conservée.

La protéine putative codée par ce gène possède une structuration en conformité avec celle caractéristique de ce type de récepteur d'éthylène avec les trois domaines transmembranaires, un signal d'adressage putatif, un domaine gaf, un domaine hystidine kinase et un domaine receveur (figure 23).

1) Organisation du gène

La séquence génomique correspondant à l'ADNc précédemment isolée a été entièrement séquencée chez CAN. Un seul intron (de phase 0) y a été identifié. Ce dernier a également été reconnu et séquencé chez quelques autres



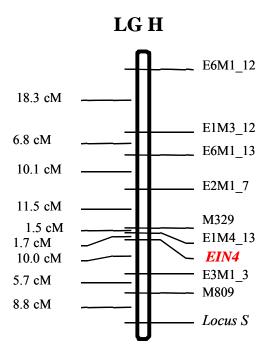


Figure 24: Localisation du gène EIN4 sur le groupe de liaison H de la carte génétique établie sur la descendance du back-cross (CAN x HET) x CAN

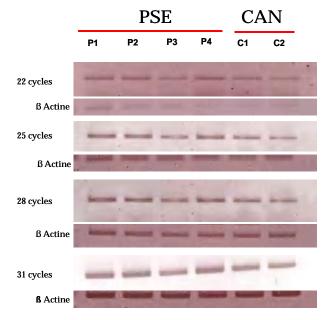


Figure 25. Analyse de l'expression du gène EIN4 par PCR semi quantitative. Les ARN totaux a été isolée à quatre stades de développement du fruit chez C. pseudozanguebariae (PSE) et deux stades chez C. canephora (CAN). La PCR a été faite en utilisant l'ADNc comme matrice et des amorces spécifiques. La réaction a été arrêtée à différent cycles pour tester l'amplification. L'actine a été ajoutée comme contrôle d'expression.



espèces du genre Coffea (CAN, PSE, DEW, ARA). Chez CAN la longueur totale de l'intron est de 2045 pb (figure 23). Chez Arabidopsis et chez la tomate, les gènes codant pour des récepteurs de cette sous-famille (AtEIN4, AtETR2, LeETR4, LeETR5, LeETR6) ne possèdent également qu'un seul intron qui se trouve à la même position en relation avec la séquence en acides aminés.

2) Criblage de la banque BAC

L'intégralité de la banque BAC de CAN, répartie sur 3 filtres à haute densité, a été hybridée avec une sonde spécifique générée par PCR en utilisant le clone d'ADNc préalablement identifié comme matrice. Huit doubles spots positifs ont été identifiés au total. La banque BAC couvrant neuf équivalent génomes, le nombre de spots positifs tend à montrer qu'il n'existe qu'une seule copie du gène EIN4 dans le génome de CAN. Un clone BAC positif a été récupéré et confirmé par PCR en utilisant les amorces spécifiques utilisées pour faire la sonde.

3) Etude de la diversité génétique chez quelques espèces du genre Coffea

L'amplification par PCR faite sur des ADN génomiques isolés de plusieurs espèces du genre Coffea, a permis de mettre en évidence un polymorphisme de longueur au sein de l'intron d'EIN4. Ce polymorphisme a permis de faire une analyse de la ségrégation des allèles parentaux dans le back-cross BCHET.

L'analyse de la ségrégation des allèles du gène EIN4 dans la population issue du back- cross [(CAN x HET) x CAN] a montré les proportions attendues (1:1) pour un locus. Ce gène a été localisé sur le groupe de liaison H, à 24,5 cM du locus S d'auto-compatibilité (Coulibaly et al., 2002) (Figure 24).

4) Etude de l'expression d'EIN4

L'expression du gène EIN4 a été étudiée au moyen de RT-PCR semiquantitative réalisée à différentes stades de développement et de maturation du fruit chez PSE (4 stades) et CAN (2 stades). Comme le montre la figure 25,



CGACGGCCCGGGCTGGTAAAAAAAAAGGTATAGAACTGTGAATTTTTGTACTATTTAAGTACGTTCTTTTAT	72
TTGTTAAGCTCTCAAC <mark>CAATTG</mark> AAAATCAA <mark>AATTCAAAA</mark> ACCAAAAGATGGAGAAGTCCACCAAAG <mark>GAAAAA</mark>	144
CTAAAAACTTTTGACAAAAGGTACATTTATAAATACAAGG <mark>CAATTG</mark> CAAC <mark>CATGCA</mark> CTTGGCGCTGGTGCCT	216
AAGATCAAAGT <mark>CTGTTG</mark> GTCTAATTTA <mark>AGAAA</mark> CGAAATTTCAACCAGTCCTGACTGAAATTTT <mark>GAAAAA</mark> GTT	288
AAGGGGGTAAATAAAAGCATGCCAAGCGT <mark>CTCAATTT</mark> TTTTTTAATAATCTTCCTGTCGTCCTCCTTATT	360
TACACCCAATTCAAGATTTGAAGATCCTCCATTGTCCATAAATTAATAAACACAAGTGTATGGATATTCTAC	432
AAAATTATTTATATTAATCTCTCACTTACTTAGTACGCCTCT <mark>CATATG</mark> CACATATTAAATACTGGATTTAAT	504
TTAATATATTCAGTGCCAAAACTAGTAGTGCTAACCTGAGGGAATA <mark>CATGCA</mark> GTCAATTCACTTACTAGAC	576
CTTCCCGCGTCCAGTGAGCTAAGTTTCTACAGATTTTT <mark>CAAGTG</mark> GGG <mark>TTCAATCC</mark> AACGTCATACTTTGAAC	648
AGTTCTTGCTGATTGACTAATGGTTTTAGTC CAAGTG GGATGTCCTATCCTATTGGGTAGGTGTCAATTTTT	720
TGTTTGCTAATATCAACACCGGTTTCACAAGCTGTGATTCTTTCT	792
ATTTTTTGGGTAGTGGAATATTGGTACGATAC <mark>AGAAA</mark> TTTTTTGGGCTTAG <mark>CTGTTG</mark> CTTGTAGAAGGTTG	864
ATTTGATGCTGGATTTCTCAAGCAAGAAGGTGTTTCCTACTCCCTCAGG <mark>TTCATTT</mark> TTGTTTTCAC CAAGTG	936
CAACTCCCTTCAGCTTTATTGGAGCCTTGACTGGATTTTGATCCCGGTTCTTTAGGCCTGCATTCTATTGTC	1008
TTGGTTCTTATGCTTTTCGTGCTACATCCTTTGAAACGGGGAGTGTTTAATGAAAAAGATTGATT	1080
ACAGATTCTGAATTTGAGCATTGACACTGAGGTGGGAATTAAATATTAT <mark>GAAAAA</mark> TAGCGTAGGAGATGGTT	1152
${\tt ACCTGAGAGAGGCTGCTATAACCTCTCAAAGATTACTTGG{\tt TTATTTTG}{\tt ATCTTGACACATAGACATATTAGA}}$	1224
TCTAGAAATGCTGGAGAGATTTGATTTATTATAGTTTATTAGGAAAGCAATTGCTATTTGGGACTGGGGTTT	1296
Boîtes TATA ? Boîte CAAT 1	
GGGGT TTAATT TCAAGGACACCTCTGTCTTGATCTT <mark>CAGTTG</mark> ATTTAAGCTTTTGAAAAGGG <mark>TGAAAACT</mark> TG Boîte TATA ?	1368

TCATAAAGATGGATTGAAAAGGGGCTGCT atg ggt tca aga tta agg gat ttt gtc ctt

1 : Terminaison 5' de l'ADNc isolé de la banque de fruits.

TGAAAACT Boîte « cereal glutenin » élément activateur graines spécifique rencontré dans le promoteur du gène LegA du petit pois.

GAAAAA Motif GT-1 de réponse aux phytopathogènes et au stress salin.

CAATTG Elément fixateur de facteur MYC trouvé dans les promoteurs de gènes actifs en réponse à la déshydratation.

CTCAATTT: Elément initiateur trouvé dans le promoteur du gène psaDb de tabac,

dépourvu de boite TATA.

CTGTTG: Eléments fixateur de facteur MYB impliqués dans la réponse aux stress environnementaux et la spécificité tissulaire (feuilles et tiges).

AGAAA. Elément associé à l'expression spécifique dans le pollen Trouvé dans le

promoteur du gène LelAT52 de la tomate

AGGTCA Elément activateur. Trouvé dans le promoteur du gène ZM13 du maïs.

CATGCA Elément « RY repeat » trouvé dans les promoteurs graines spécifiques

CATATG: Elément Impliqué dans la réponse à l'auxine.

AATTCAAAA Elément de réponse à l'éthylène (ERE - ethylene responsive element).

Figure 26. Séquence promotrice de CcEIN4 (1397 pb, jusqu'au site d'initiation de la traduction (ATG)). Dans cette séquence, quelques boîtes conservées sont montré.



ce gène montre chez PSE un niveau d'expression identique aux deux premiers stades du développement. Le niveau d'expression semble baisser au troisième stade qui correspond approximativement au stade « C » décrit par (De Castro et Marraccini, 2006) ; c'est à dire, au stade vert. Puis ce niveau remonte légèrement au dernier stade, celui du fruit mûr, stade « D » décrit par ces auteurs.

5) Etude de la séquence promotrice de CcEIN4

Afin de mieux comprendre la régulation de l'expression du gène EIN4, l'étude de la séquence promotrice a été entreprise. Un des clones BAC, préalablement identifié comme contenant ce gène, a été sous-cloné après digestion incomplète par Eco RV dans le vecteur TOPO® Shotgun (Invitrogen). Soixante dix clones, choisis au hasard, ont été séquencés (SeqWrigh, USA. http://www.seqwright.com), mais aucun ne correspondait à la séquence recherchée. Une nouvelle stratégie, basée sur l'approche « marche sur chromosome » a été adoptée. Celle-ci a donné de meilleurs résultats. Le clone BAC a tout d'abord été digéré partiellement par l'enzyme Dra I. Après ligation d'adaptateurs, sur les fragments issus de la digestion, on a utilisé ceux-ci comme matrice pour réaliser des PCR nichées. Un fragment d'environ 1500 pb a été obtenu. Après purification, ce fragment a été cloné dans le vecteur pCR4®-TOPO (Invitrogen) et séquencé (MWG).

L'analyse de la séquence, longue de 1427 pb, a confirmé que celle-ci correspondait bien à la région située en amont du codon d'initiation de la traduction (ATG) de CcEIN4. En effet, l'amplification a été faite de telle sorte que le produit obtenu chevauche la région connue en 5' de l'ADNc. En considérant le début de notre ADNc comme correspondant au site d'initiation de la transcription, la séquence promotrice ainsi isolée est longue de 1366 nucléotides. Cette séquence a été analysée in silico et des cis éléments régulateurs spécifiques ont été identifiés.

La figure 26 illustre les différents éléments cis régulateurs identifiés sur la séquence promotrice de CcEIN4. Des éléments indispensables des promoteurs d'eucaryotes comme trois boîtes TATA et une boîte CAAT putatives ont été respectivement localisées à -59, -104 et -112 pb pour la TATA et -91 pb pour la CAAT, du site putatif d'initiation de la transcription, en fait en amont



Tableau 4. Résultats de blastx sur GenBank obtenus avec les séquences présentes sur le clone BAC où se trouve le gène du récepteur d'éthylène CcEIN4.

Contig	Nombre	Séquence	similarité en SOL GENOMICS data	
N	pb	GenBank	base de C. canephora	
9	777	DV692295	Canephora feuille	
	'''	DV690909	Canephora feuille	
10	421	DV692295	Canephora feuille	
		DV690909		
		DV672461	PERICARP	
		DV664700	PERICARP	
		DV663510	PERICARP	
17	1119	DV713236	seed late development stage	
		DV703481	seed late development stage	
22	783	DV705248	Cherry of early developmet	
23	791	DV685577	seed of midle development stage	
24	798	DV675586	PERICARP	
	. , ,	DV663360	PERICARP	
		DV678454	PERICARP	
29	921	DV692405	Canephora feuille	
30	623	DV676568	Cherry of early developmet	
		DV691281	Canephora feuille	
		DV687654	Canephora feuille	
35		DV680097	seed of midle development stage	
		DV688362	seed of midle development stage	
39	772	DV688892	Leaf 5'UTR	
		DV675990	PERICARP	
		DV704754	CHERRY	
		DV713404	CHERRY	
		DV712680	CHERRY	
		DV713680	CHERRY	
		DV667616	PERICARP	
63	638	DV700342	seed late development stage 5'	
		DV698393	seed late development stage 5'	
64	818	DV692183	CAN LEAF	
68		DV694619	seed late development stage 5'	
71		DV683649	seed of middle development stage 5'	

Contig	Nombre	Séquence	
N	pb	GenBank	Espèce
			S. lycopersicum seed. Alfa
14	799	AI777388	Galactosidase
18	801	AJ533550	P. persica. Preclimacteric fruit
31	892	CD444962	Z. mays. Endosperm
40	1277	BF633291	M. truncatula. Sécheresse
43	240	CA092975	S. officinarum
44	767	AW036380	S. lycopersicum. Seed cDNA
49	1944	BQ157352	M. truncatula. Irradié
67	377	AJ533021	P. persica cDNA



de la première base du clone d'ADNc. Différents cis éléments de réponse aux hormones ont été trouvés :

- Un élément de réponse à l'éthylène, (ERE) similaire à celui trouvé dans le promoteur du gène LeE4 de la tomate (aattcaaaa).
- Un élément spécifique de réponse à l'auxine (boîte catatg).
- Un élément de réponse à l'acide abscissique (boîte catgca).

D'autres éléments cis régulateurs ont aussi été trouvés, en particulier des éléments contrôlant l'expression spécifique dans certains tissus :

- Un cis élément (tgaaaact) homologue à la « cereal glutenin box » (tgtaaaagt), qui est un élément de contrôle du gène du gluten chez les céréales, et qui est responsable de l'expression dans les graines.

Finalement, le motif GT-1, et le site MYC qui jouent tous deux un rôle important dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques (phytopathogènes, salinité, stress hydrique) se trouvent dans cette séquence.

6) Etude de quelques séquences voisines du gène CcEIN4

Le clone BAC préalablement identifié comme contenant le gène CcEIN4 a été sous-cloné dans le vecteur TOPO® Shotgun (Invitrogen). Soixante dix clones ont été séquencés. La majorité des séquences (62%) sont non codantes mais, quelques séquences intéressantes sont liées physiquement au gène du récepteur d'éthylène. Elles sont présentées dans le tableau 4. On peut noter en particulier que des gènes putatifs similaires à des gènes exprimés au cours de la floraison ou pendant le développement du fruit chez d'autres espèces, mais aussi chez CAN, sont situés dans le voisinage immédiat de CcEIN4. En particulier, une recherche Blastn sur les EST de caféier (SOL GENOMICS NETWORK: http://www.sgn.cornell.edu/tools/blast/) montre des homologies avec des gènes exprimés pendant le développement du grain de café.

Deux clones montrent une forte similitude avec un marqueur moléculaire, utilisé pour l'identification de QTLs de résistance à la rouille orangée des caféiers (Hemileia vastatrix) (n° d'accession AJ318867) (Paiva,J.A. Non publié). Un gène contrôlant un facteur de transcription de type ERF/AP2



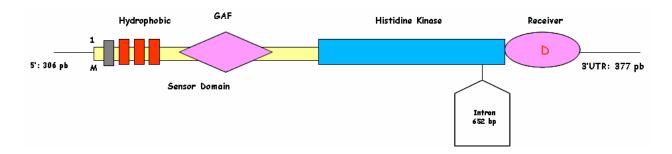


Figure 27. Structure du gène ETR2 chez C. canephora. Peptide signal putatif qui dirigerait la protéine vers la voie de sécrétion. Sensor domain : domaine senseur subdivisé en : Comaine trans-membranaire et GAF : domaine conservé mais de rôle inconnu; Histidine Kinase : domaine Histidine Kinase, ce domaine est interrompu par un intron de 652 pb. de phase 0; Receiver : domaine de réponse, possède le site conservé de phosphorylation aspartate (D).



est aussi situé sur ce clone BAC. Ce dernier gène a été amplifié par l'approche « marche sur le chromosome » et sera présenté plus loin dans ce mémoire.

C. Etude du gène ETR2

1. Amplification de l'ADNc

En utilisant la première stratégie pour l'amplification de l'ADNc d'ETR2; c'est-à-dire avec des amorces spécifiques dessinées à partir d'une séquence de C. arabica et les amorces universelles T3 et T7, nous avons amplifié un fragment de 2061 pb à partir de la banque d'ADNc de fruits de C. canephora. Ce fragment contient la région 3' terminale de la région codante qui code pour les 560 derniers acides aminés du récepteur, ainsi que le 3'UTR. En utilisant l'approche « marche sur le chromosome » sur de l'ADN génomique de C. canephora et avec des amorces dessinées à partir du fragment isolé précédemment, nous avons amplifié un fragment de 905 pb qui contenait la partie manquante en 5' de la partie codante plus le 5'UTR et une portion de la région promotrice. La séquence totale que nous avons amplifiée (entre l'ADN génomique et l'ADNc) mesure 2966 pb. Elle contient une ORF de 2283 pb, codant une protéine de 760 acides aminés, avec un poids moléculaire de 84,13 kDa et une séquence 3'UTR de 377 pb. La région 5', amplifiée de l'ADN génomique comprend 306 pb (figure 27).

Finalement, pour l'analyse de la sur-expression dans les plantes modèles, un ADNc pleine longueur, de l'ATG au codon stop, a été amplifié à partir de l'ADNc monocaténaire synthétisé à partir d'ARN isolés au deuxième stade de développement du fruit chez C. canephora.

La séquence nucléotidique de cet ADNc est à 37,7% et 59,7% identique à celles de CcETR1 et CcEIN4 respectivement. La séquence du polypeptide prédit est à 70,5% identique à celle du produit du gène NTHK1 de N. tabacum et à 68,6% à celui du gène LeETR4 de S. lycopersicum. Le segment N- terminal de ce polypeptide, correspondant aux domaines transmembranaires plus au domaine GAF, est conservé. Il a respectivement 77,7% et 75,4% d'identité avec NTHK1 de N. tabacum et LeETR4 de S. lycopersicum, respectivement. La figure 13 montre l'alignement de ces séquences.



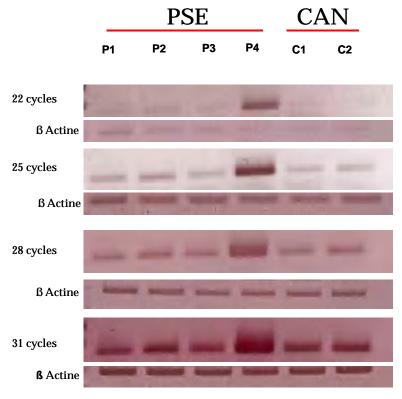


Figure 28. Analyse de l'expression du gène ETR2 par PCR semi quantitative. Les ARN totaux ont été isolés à quatre stades de développement du fruit chez C. pseudozanguebariae (PSE) et deux stades chez C. canephora (CAN). La PCR a été faite en utilisant l'ADNc comme matrice et des amorces spécifiques. La réaction a été arrêtée à différents cycles, tous les 3 cycles à partir du 22ème. La β actine a été ajoutée comme contrôle.



2. Etude de l'organisation du gène

La séquence génomique du gène CcETR2 a été amplifiée à l'aide des amorces spécifiques préalablement dessinés sur la base de la séquence de l'ADNc. Le gène CcETR2 ne contient qu'un seul intron. Cet intron a été séquencé chez trois espèces de Coffea (CAN, PSE, DEW). Chez CAN la longueur totale de l'intron est de 652 pb. Il existe un polymorphisme interspécifique; l'intron mesure 656 pb et 650 pb chez PSE et DEW respectivement. A ce jour, l'étude de la population de cartographie BCDEW n'a pas pu aller à son terme.

3. Etude de l'expression de ETR2 chez CAN et PSE

Des RT-PCR semi-quantitatives ont été faites pour étudier l'expression de ce gène dans les deux espèces CAN et PSE à différentes stades de développement et de maturation du fruit. Chez CAN, son expression est plus importante au dernier stade de maturation du fruit, tandis que chez PSE, le niveau d'expression de ce gène augmente au deuxième stade pour descendre au troisième et finalement augmenter significativement au dernier stade. La figure 28 illustre ces résultats.

D. Etude du Facteur de Transcription CcERF2

1. Clonage de l'ADNc

Lors du criblage des banques d'ADNc pour la recherche de l'ADNc correspondant à ETR1, quelques colonies positives ont montré une bande d'environ 1,4 kb. Après séquençage, et analyse par Blast, ces clones correspondaient en fait à un ADNc qui contrôle un facteur de transcription de la famille AP2/ERF. Un ADNc pleine longueur a pu être isolé, il a une longueur de 1317 pb, avec une ORF putative de 987 pb. Le polypeptide prédit contient 329 acides aminés, sa masse moléculaire est de 36,34 kDa. Ce polypeptide contient le segment GBD qui reconnaît la boîte GCC (GCC Binding Domain) des promoteurs. La séquence en AA est à 98,3% identique à celle de LeERF2 de S. lycopersicum (Tournier et al., 2003).



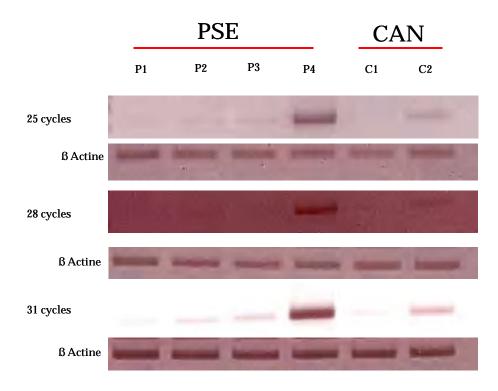


Figure 29. Analyse de l'expression du gène du facteur de transcription ERF2 par PCR semi quantitative. Les ARN totaux ont été isolés à quatre stades de développement de fruit chez C. pseudozanguebariae (PSE) et à deux stades chez C. canephora (CAN). La PCR a été faite en utilisant l'ADNc comme matrice et des amorces spécifiques. La réaction a été arrêtée à différent cycles pour tester l'amplification. L'analyse de la Beta actine a été ajoutée comme contrôle.



Nous avons nommé ce gène CcERF2. Il appartient au groupe VII de la classification faite par Nakano et al., (2006). Une particularité de groupe VII est que la protéine possède un domaine conservé dans la région N-terminale ; le motif MCGGAI(I/L (de fonction inconnue). La description de cet ADNc a fait l'objet d'une publication (Bustamante-Porras et al., 2005).

2. Etude de l'expression d'ERF2 chez CAN et PSE

Comme pour les autres gènes, nous avons analysé par RT-PCR semiquantitative l'expression de ce gène aux mêmes stades de développement et de maturation du fruit chez CAN et chez PSE.

Chez PSE, l'expression de ce gène est basse au premier stade, elle augmente légèrement aux deux stades suivants pour augmenter significativement au dernière stade de maturation du fruit. Chez CAN, l'expression du gène est supérieure au deuxième stade. Ces résultats sont présentés sur la figure 29.

•

E. Etude du Facteur de Transcription ERF1

1. Clonage du gène CcERF1

Une séquence, résultant de l'assemblage de deux sous clones issus du BAC portant CcEIN4, a été analysée. Après une analyse blast, ce fragment présente des similitudes avec un gène codant pour un facteur de transcription de type ERF/AP2. Une marche sur le chromosome a permis d'amplifier le reste du gène. Un fragment d'environ 1000 pb a été récupéré puis séquencé. L'analyse de la séquence a confirmé qu'elle correspondait à la partie manquante de la région codante et à la région 5' de de CcERF1.

La séquence assemblée, contient 758 pb correspondant à la région 5'; 705 pb correspondent à la région codante et 849 pb à la région 3' de CcERF1. Le polypeptide prédit contient 234 acides aminés, sa masse moléculaire est de 26,37 kDa. Le domaine caractéristique de cette famille de facteurs de transcription, le segment GBD (qui reconnaît la boîte GCC) a été identifié dans cette séquence protéique.



J Group IX (B-3) AtERF#091 (At4g18450) AtERF#092 (At3g23240) ERF1 AtERF#093 (At2g31230) AtERF15 AtERF#094 (At1g06160) С AtERF#095 (At3g23220) AtERF#096 (At5g43410) AtERF#097 (At1g04370) AtERF14 AtERF#098 (At3g23230) TDR1 AtERF#099 (At2g44840) AtERF13 AtERF#100 (At4g17500) AtERF1 AtERF#101 (At5g47220) AtERF2 AtERF#102 (At5g47230) AtERF5 AtERF#103 (At4g17490) AtERF6 AtERF#104 (At5g61600) b AtERF#105 (At5g51190) AtERF#106 (At5g07580) AtERF#107 (At5g61590) AP2/ERF domain CMIX-4 CMIX-1 CMIX-5 CMIX-2 CMIX-6 CMIX-3

Figure 30. Groupe IX de la famille de gènes ERF d'Arabidopsis. Classification faite par Nakano et al., (2006).

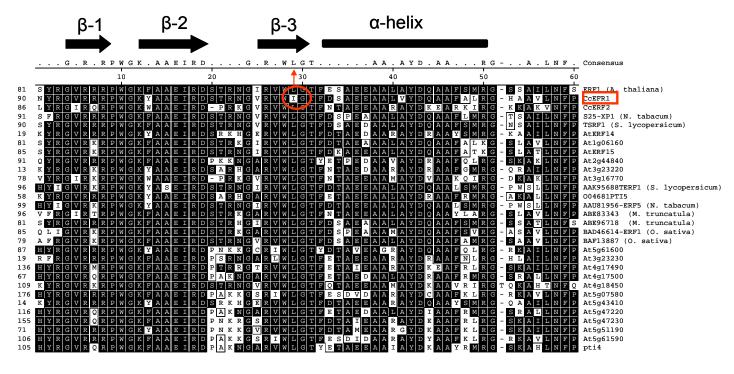


Figure 31. Alignement du domaine AP2/ERF de protéines putatives CcERF1, CcERF2 et leurs homologues d'Arabidopsis. La barre et les flèches noires représentant les hélices alpha et les feuillets béta décrits par Allen et al., (1998).



ATTACCCTCCTAGGGACTAGTCCTGCAGGTTTAAACGAATTCGCCCTTGT	-707
AATACGACTCACTATAGGGCACGCGTG <mark>GTCGAC</mark> GGCCCGGGCTGGTAAAC	
TTTCCTTCCCACCTAAAATAGGATATATTAGATTATAGGAATGTTATCTT	-607
TGCAAAAAAAAAAATCCTAATTCATTCAAAATAACATGAGGAGTAATTG	
${\tt TTAACCACC} {\tt TTGAC} {\tt TGAGGGGGTAAAAGGCTTTGGATTAAATAGGGCC} {\tt CACT}$	-507
TG GTCAGCAAAACAATCTCCTATGCTGATACAAAATTTGTGA TTGACC CT	
GCCACAAAGTGCCAAGTGGACCGGGATAGGAATTGTGATGATTGCGTTGC	-407
TATAATAGATTATTAGTTGCCAAATATATCATCAACAAT <mark>GACGTC</mark> ACAGA	
ACTCTCATG <mark>GCCGCC</mark> AAGTCCACCGAGTCGT TTGAC T <u>C</u> ACGTGTCCGTTG	-307
ATCTCCAGTTTTCTCCCTAGACCAGAGCAAAGTCTTTCAGGTCCCACTCC	
CTACCCCTCAAATGGGACAAAGACCAGAATTCTTTTTTGTGG <u>CCGAAA</u> CA	-207
AA GACCACAATTTGGTTGGGTTAAAACAATTCCAATTGTATCAATCA	
TACTGTTGTCAATGTCGCTGATAAGCTATTTTAATTCCTCCCGTTCGTGT	-107
GCCTCGTACCTACTATATAAACGGATAAACCCCGTCTTTGATTTTCAGTT	-57
CTAATCGCATTATCTATCGTTGTTCAGTCGTAAACCTTAACAATTTGAAC	
TCATTC atg gat tat tca tca ttt ccg cag cat	

TATATAAA: TATA BOX CAAT Boîte CAAT

AAACAAA: ANAERO1CONSENSUS., anaérobiose.

CCGAAA LTRE1HVBLT49 "LTRE-1" (low-temperature-responsive element)

ACGTGTC ABRELATERD1. ABRE. ABA Response Element

TTGAC WBOXATNPR1"W-box"

GCCGCC: GCCCORE. Boîte GCC-, "pathogen-responsive genes"

GACGTC: ACGTCBOX "C-box"

CAAGTG: EBOXBNNAPA E-box de napA storage-protein gène de B. napus

TTGACC: ELRECOREPCRP1 ElRE (Elicitor Responsive Element)

GTCGAC: CRTDREHVCBF2."CRT/DRE motif". réponse à la température.

Figure 32. Séquence promotrice de CcERF1 (756 pb, jusqu'au site d'initiation de la traduction (ATG)). Dans cette séquence, quelques boîtes conservées sont montré.



La séquence en acides aminés est à 53% identique au facteur TSRF1 de réponse au stress de la tomate. Une analyse phylogénétique montre que ce facteur de transcription appartient au group IX et au sous-groupe C de la classification faite par Nakano et al., (2006), (figure 30). Tous les gènes inclus dans ce sous groupe sont impliqués dans les réponses de défense contre des phytopathogènes. La figure 31 montre l'alignement du domaine AP2/ERF. On remarque une très bonne conservation de ce domaine sauf notablement, la leucine 29 qui est substituée par une isoleucine.

2. Etude de la séquence promotrice du CcERF1

La séquence promotrice isolée, longue de 756 pb, a été analysée in silico. Une boîte TATA (TATATAAA) et une boîte CAAT (CAAT) putatives ont été respectivement localisées à -135 pb et -185 pb du codon d'initiation de la traduction (ATG). Différents éléments cis potentiels sont présents dans cette séquence promotrice. Une boîte GCC (GCCGCC), un élément EIRE : « Elicitor Responsive Element » (TTGACC) et une boîte W (TTGAC) trouvés dans les promoteurs de nombreux gènes de réponse à des attaques de phytopathogènes sont également localisés dans cette séquence. Des éléments cis comme AAACAAA, GTCGA, CCGAAA; décrits comme étant sollicités en réponse à l'anaérobiose et aux basses températures ont été trouvés. L'élément ACGTGTC de réponse à l'acide abscissique (ABA) est aussi présent (figure 32).

F. Etude de transformants avec les gènes de récepteurs d'éthylène des caféiers

Des plantes d'A. thaliana ont été transformées avec les séquences codantes de CcETR1 et CcEIN4, en orientation sens ou antisens, sous le contrôle du promoteur 35S du CaMV. Une dizaine de lignées T2 d'A. thaliana résistantes à l'hygromicine et représentant des évènements de transformation indépendants ont été retenues pour chaque construction génique. Les plantes transformées ont été testées sur milieu ½ MS supplémenté avec différentes concentrations de NaCl, sucrose, ACC. Les résultats préliminaires de l'analyse de ces transformants sont donnés ci-dessous.



Tableau 5. Croissance racinaire de plantes d'Arabidopsis transformése, avec les gènes CcETR1 ou CcEIN4 en orientation sens ou antisens sur milieu à salinité croissante. L'écotype Columbia non transformé est utilisé comme témoin.

Transformant	Longueur racine	Longueur racine		
11 ansionnant	50 mM NaCl	100 mM NaCl		
Columbia 0	$14,800 \pm 8,702$	$13,333 \pm 3,983$		
CcETR1 Sens	$15.250 \pm 10,935$	11,676 ± 8,845		
CcEIN4 Sens	$20.125 \pm 10{,}102$	$11,156 \pm 7,171$		
CcETR1 Anti Sens	31.860 ± 13,094	13,472 ± 6,482		
CcEIN4 Anti Sens	40.857 ± 11,629	20,412 ± 10,148		

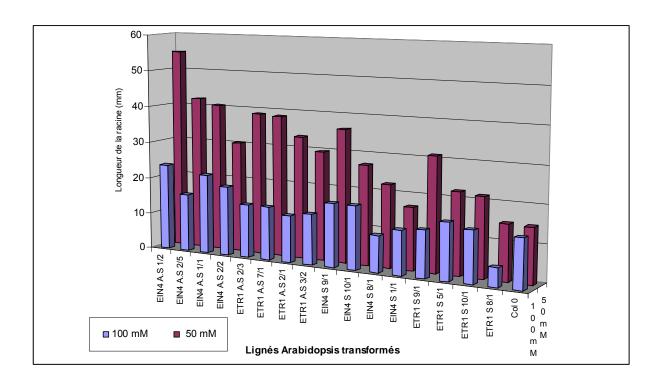


Figure 33. Croissance racinaire moyenne de différentes lignées d'Arabidopsis transformés avec CcETR1 ou CcEIN4 en orientation sens S ou antisens AS, L'écotype Columbia non transformé est utilisé comme témoin (Col 0).





Figure 34. Plants de tabac transgéniques transformés avec CcETR1 en orientation sens. Détail de la fleur sans étamines.



1. Analyses de la sur-expression de CcETR1 et CcEIN4 chez A. thaliana

Les plantules étiolées d'Arabidopsis qui sur expriment CcETR1 ou CcEIN4 perdent l'orientation verticale en absence d'éthylène et montrent un gravitropisme anormal. Cette caractéristique est similaire à celle présentée par les mutants insensibles à l'éthylène. Cependant, en présence de cette hormone, les plantes transformées montrent un phénotype sauvage restauré, caractéristique de la triple réponse. Tout laisse croire qu'elles se comportent comme des plantes insensibles aux basses concentrations d'éthylène.

2. Analyses de la suppression de CcETR1 et CcEIN4 chez A. thaliana

Les plantes transformées avec la construction CcEIN4, et dans une moindre mesure CcETR1, en orientation anti-sens, montrent une tolérance à la salinité à 50 et 100 mM de NaCl. Le tableau 5 donne les valeurs de la croissance des racines des plantules mises en culture dans ces conditions. La figure 33 illustre la croissance racinaire de différentes lignés transformées.

3. Analyses de la sur expression de CcETR1 chez N. tabacum

Des plants T1 de N. tabacum transformées avec la construction 35S :: CcETR1 en orientation sens et résistantes à l'antibiotique, ont donné un résultat positif par PCR quant à la présence du gène d'intérêt. Ces plantes exhibent un phénotype normal en apparence jusqu'à la floraison. Les fleurs par contre n'ont pas d'étamines, elles sont donc mâle stériles. La figure 34 illustre ce phénotype. La récupération de graines issues de ces plantes nécessitera la réalisation de croissements et donc le maintient du transgène à l'état hétérozygote.



DISCUSSION

Les travaux décrits dans ce mémoire ont été réalisés dans le cadre d'un projet portant sur l'amélioration de la qualité du café boisson. Pour bien comprendre certains déterminismes génétiques liés à cette qualité, nous avons étudié quelques gènes impliqués dans la cascade du signal de transduction induit par l'éthylène chez les caféiers. Les gènes étudiés contrôlent quelques récepteurs d'éthylène et des facteurs de transcription qui interviennent à la fin de la cascade du signal de traduction de l'éthylène et qui activent d'autres gènes en réponse à cette hormone. Nous avons isolés ces gènes et étudié leur organisation. Nous avons établi leur caractérisation moléculaire et analysé leur expression pendant le développement et la maturation du fruit. Nous avons aussi entrepris l'étude de la diversité génétique intra et interspécifique, ainsi que l'étude de la ségrégation de certains de ces gènes dans différentes populations issues de back-cross. La localisation sur certaines cartes génétiques disponibles et des relations entre un des récepteurs d'éthylène et des caractéristiques agronomiques et biochimiques ont été établies.

C'est la première fois que ce type de gènes est décrit chez les caféiers. Pour éviter d'ajouter à la confusion, nous avons adopté une nomenclature basée sur les similitudes trouvées avec les gènes correspondants chez Arabidopsis thaliana, bien qu'ils soient souvent plus similaires à ceux des solanacées comme ceux de : Petunia hybrida, Solanum lycopersicum ou Solanum tuberosum.

A.- Le gène ETR1 chez les caféiers

ETR1 est le récepteur d'éthylène le plus étudié chez les plantes. Le gène qui le contrôle a été le premier gène de récepteur isolé chez Arabidopsis. Il semble être le plus complexe parmi les trois gènes que nous avons étudiés chez les caféiers. Le nombre et la position des introns sont conservés par rapport aux autres espèces chez lesquelles la structure du gène a été décrite (Arabidopsis et pêcher). Ce gène, présent sous la forme d'une seule copie dans le génome de CAN, possède cinq introns dans la région codante et un intron



additionnel qui interrompt une petite ORF localisée dans la région 5'UTR du transcrit primaire. La taille et la séquence des cinq premiers introns (celui de la région 5'UTR et les quatre premiers de la région codante) sont très similaires entre les espèces de caféiers étudiées, le cinquième intron, le plus long, par contre varie en taille et en séquence entre les espèces. La différence de taille est due à des insertions ou délétions (indels) dans ces séquences.

1. Diversité génétique d'ETR1 chez les caféiers

Grâce au polymorphisme observé dans le dernier intron du gène, nous avons étudié la diversité intra et interspécifique dans le genre Coffea. Chez C. arabica, il est possible d'amplifier par PCR deux bandes de taille différentes (espèce tétraploïde). La séquence correspondant à la bande la plus courte est à 99,5% identique à celle de C. canephora. Par contre, la bande la plus longue a une séquence identique à 99,3% à celle de C. eugenioides. Ce résultat va dans le sens de l'origine proposée pour les deux génomes parentaux de C. arabica, à savoir, C. canephora et C. eugenioides (Lashermes et al. 1999). Cependant la question de l'origine de l'autofertilité de C. arabica demeure, en effet les deux espèces précédentes sont toutes deux allogames. Par contre seules deux espèces diploïdes sont auto compatibles, C. heterocalix et C. moloundou. Il se trouve que la deuxième bande observée chez C. arabica, est à 98,8% identique à celle de C. moloundou. Bien que ce résultat soit insuffisant pour mettre en doute l'origine de l'espèce tétraploïde C. arabica, il serait sans doute intéressant de faire une étude comparative du mécanisme d'auto compatibilité chez C. moloundou et C. arabica.

Parmi les autres espèces observées, toutes diploïdes, une grande conservation des séquences a été remarquée, que ce soit dans les parties codantes (exons) ou dans les parties non codantes (introns). Mêmes les séquences introniques sont quelquefois identiques à 100% entre espèces pourtant éloignées (C. canephora et C. pseudozanguebariae). Le fait que ces gènes soient tant conservés, montre l'importance de la fonction de récepteur d'éthylène. Par ailleurs, l'éloignement phylogénétique déterminé sur d'autres critères (Lashermes et al., 1997; Cros et al., 1998) ne semble pas se retrouver au niveau de ce gène. Il est même surprenant de trouver une telle conservation pour une fonction qui pourrait être complémentée, ou



compensée, par d'autres récepteurs en cas de mutations délétères (Tieman et al., 2000). Il faut noter cependant que chez CAN, CcETR1 est assez éloigné des autres gènes de récepteurs identifiés, bien que certains auteurs considèrent que tous ces gènes sont membres d'une même famille multigénique (Hua et Meyerowitz, 1998).

Le polymorphisme interspécifique identifié au sein du genre Coffea, nous a permis d'effectuer des analyses de ségrégation. En analysant la descendance du back-cross [(PSE x DEW) x DEW], nous avons pu montrer que les allèles ETR1 présents sont liés de manière significative à plusieurs caractères agronomiques et biochimiques : la durée du cycle de fructification, la durée de maturation de l'albumen, le poids de 100 grains (P100) la teneur en caféine et celle en 3 CQA et 3,5 DiCQA. Malheureusement, dans ce même back-cross la liaison avec des marqueurs moléculaires cartographiés n'est pas assez pertinente pour permettre de placer ce gène sur la carte génétique et définir ainsi des QTL. Dans d'autres populations en ségrégation, par exemple dans la descendance des back-cross [(CAN x HET) X CAN] et [(LIB x CAN) X CAN], il nous a été possible de situer ETR1. sur les cartes génétiques correspondantes mais malheureusement, ces populations n'ont pu être analysées pour des caractères agronomiques et biochimiques (Coulibaly et al., 2003); (N'Diaye et al., 2005).

2. Possible régulation post transcriptionelle d'ETR1 chez les caféiers

L'analyse des niveaux d'expression d'ETR1 à différentes stades de développement et de maturation du fruit, montre que ce gène est uniformément exprimé pendant les différents stades observés. Ce résultat indique que très probablement le récepteur codé par ce gène maintient un niveau de base de perception de l'éthylène pendant le développement du fruit et qu'il ne joue un rôle principal ni dans les processus de maturation ni pendant la crise climactérique du fruit de caféier.

L'analyse de différents transcrits isolés chez PSE et CAN à différent stades de développement du fruit ainsi qu'à partir de la banque d'ADNc de fruits, indiquent qu'il existe sans doute une régulation post-transcriptionnelle complexe de l'expression de CcETR1 :



- Trois clones d'ADNc pleine longueur isolés se diffèrencient par la taille de leur région 3'UTR. Ceci indique qu'ils possèdent des sites de polyadénylation alternatifs et que les transcrits qui en résultent peuvent se différencier par leur stabilité et donc leur aptitude à être traduits.
- La région 5'UTR renferme un court cadre de lecture susceptible de coder un petit polypeptide (upstream Open Reading Frame : uORF). Cette uORF est interrompue par un intron conservé chez quelques espèces de Coffea. Cette uORF et son intron peuvent interagir de différentes manières avec l'expression du gène. Au niveau de la maturation du transcrit primaire, un intron situé en 5' peut avoir un effet activateur de l'expression génique (Plesse et al., 2001) alors qu'au niveau de la traduction, une uORF peut provoquer une interaction avec la fixation des ribosomes qui résulte en une entrave à la traduction (Mize et al., 1998).
- L'analyse des amplicons obtenus par RT-PCR sur des ARN purifiés à différents stades de développement du fruit, montre des transcrits de taille différente. Ces résultats suggèrent qu'ETR1 connaît des épissages alternatifs résultant chez C. canephora en des transcrits susceptibles d'être traduit en des récepteurs tronqués, manquant de leur domaine receveur, ou dans le cas de PSE en de nombreux transcrits dont certains ne pourraient conduire à des protéines fonctionnelles. Ce qui dans ce cas fait plus penser à une déficience du spliceosome en plus d'un possible épissage alternatif. Cette possible déficience du spliceosome chez PSE est supportée par les résultats obtenus par Caillieux, (2004) sur des gènes codant pour des N-Méthyltransférases impliquées dans la biosynthèse de la caféine.

B.- Le gène EIN4 chez les caféiers

1. CcEIN4, un gène à la structure moins complexe

Nous avons appelé EIN4 le deuxième gène de récepteur d'éthylène étudié chez les caféiers par analogie avec les gènes d'Arabidopsis mais son ADNc isolé à partir de la banque d'ADNc de fruits de C. canephora, montre une plus grande similitude avec les séquences correspondantes de Solanacées, comme LeETR5 de la tomate.

La structure du gène, une fois établie, ne montre la présence que d'un seul intron. Cette structure est également celle du gène EIN4 d'Arabidopsis et de tous les orthologues isolés jusqu'à présent à partir de différentes espèces. Cet intron, avec 2045 pb de longueur dans le génotype de CAN que nous avons étudié, n'a pas été trouvé très variable parmi les espèces de caféiers étudiées. Ces résultats réaffirment l'importance de la fonction de récepteur d'éthylène. Même si leur fonction peuvent complémentées chacun a un profil d'expression spatio-temporelle spécifique, ce qui montre leur particularité et le fait que chacun d'eux soit essentiel au bon fonctionnement du métabolisme. Ceci pourrait expliquer la grande conservation de ces gènes au travers de l'évolution.. Cependant, il renferme un polymorphisme d'indels suffisant qui nous a permis de le placer sur la carte génétique du back-cross [(CAN x HET) x CAN]. Ce gène a été placé sur le même groupe de liaison que le locus S d'auto-compatibilité identifié par Coulibaly et al., (2002). Ce résultat est particulièrement intéressant car il a été montré que l'éthylène pourrait jouer un rôle dans l'auto incompatibilité gamétophytique (Kovaleva et Zakharova, 2003). Il est possible que CcEIN4 joue un rôle dans la transmission du signal qui active un ou des facteurs de transcription qui eux-mêmes en combinaison avec l'ABA et des cytokinines régulent ce mécanisme d'auto incompatibilité, que ce soit la germination ou la croissance du tube pollinique. Cependant, les deux locus sont très éloignés sur la carte génétique BCDEW et aucune assimilation entre les deux fonctions ne peut être établie. De plus, sur une autre carte génétique, celle issue de la descendance du backcross BCHET, EIN4 et S ne sont plus sur le même groupe de liaison se qui confirme bien qu'il s'agit de deux locus distincts et éloignés génétiquement. On peut juste se demander s'il ne s'agit pas là d'une trace de l'évolution et qu'une fonction ait



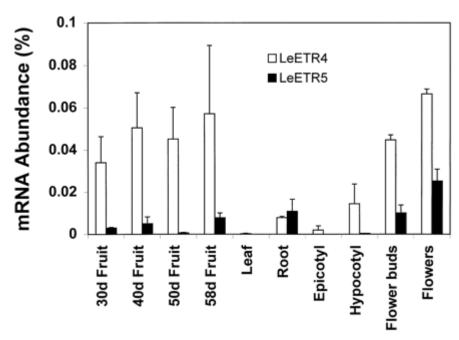


Figure 35. Expression de LeETR4 et LeETR5 dans les fruits, fleurs et tissus végétatifs chez la tomate. D'après ((Tieman et Klee, 1999).



dérivée de l'autre par duplication de cette région chromosomique.

L'expression d'EIN4 dans les fruits de caféiers est en concordance avec le profil d'expression de son homologue LeETR5 (figure 35) chez la tomate. L'expression de ce gène augmente au deuxième stade de développement pour diminuer au troisième (50 jours après l'anthèse) et de nouveau augmenter au dernier stade (Tieman et Klee, 1999). Chez la tomate les différents stades de développement et de maturation correspondent à des fruits à 30, 40, 50 et 58 jours après la floraison (immature, mature vert, orange et mature rouge, respectivement) Ces stades chez les fruits de tomate correspondent approximativement aux 4 stades observés chez PSE. Les deux stades de CAN correspondent eux aux stades 2 et 4 de la tomate. Il est possible que lors de la maturation, au moment du changement du system I au system II, il existe une pause. A ce moment, il semble que le fruit se prépare à la crise climactérique.

2. Le promoteur de CcEIN4 serait fleur et graine spécifique

La séquence promotrice du gène CcEIN4 analysée in silico montre la présence de plusieurs boîtes TATA potentielles mais une seule boîte CAAT. Une seule des boîtes TATA se situe en aval de la boîte CAAT comme c'est en général le cas dans les promoteurs d'eucaryotes. Cette séquence promotrice est caractérisée par la présence d'une boîte très conservée et caractéristique de la réponse à l'éthylène (AATTCAAAA). Cette boîte est similaire à celle trouvée dans le promoteur du gène « fruit ripening » LeE4 de la tomate (Montgomery et al., 1993). On trouve aussi des éléments cis activateurs ou qui confèreraient une spécificité tissulaire à l'expression de ce gène comme trois fois l'élément AGAAA, qui active l'expression spécifique dans le grain de pollen du gène « lat52 », de la tomate mais qui seul ne peut conférer cette spécificité (Bate et Twell, 1998). On trouve aussi un autre élément activateur de même type (AGGTCA) décrit dans le promoteur pollen spécifique du gène ZM13 du maïs. Cet élément active l'expression spécifique dans le grain de pollen mais ne peut assuré cette spécificité d'expression (Hamilton et al., 1998).

Un autre élément, le «RY-repeat» (CATGCA) a aussi été identifié trois fois. Cet élément décrit dans la promoteur du gène LeB4 qui code pour une légumine de la fève, confère la spécificité d'expression dans les grains (Baumlein et al., 1992), Il a ensuite été décrit et sa fonction a été précisée dans plusieurs promoteurs graines spécifiques comme dans le promoteur du gène



napA de B. napus (Ezcurra et al., 1999). On trouve également la boîte « cereal glutenin » élément activateur graines spécifique rencontré dans le promoteur du gène LegA du petit pois.(Shirsat et al., 1989) mais cet élément se situe en aval de la boîte TATA et juste avant le début de notre clone d'ADNc dont nous ne savons pas s'îl correspond au site réel d'initiation de la transcription. Il arrive de trouver des éléments cis régulateurs en aval de la boîte TATA et même en aval du site d'initiation de la transcription. On les désigne alors sous le terme d'éléments de promoteur en aval ou « downstream promoter element (DPE) » mais de tels éléments n'ont été décrit que chez les animaux (Burke and Kadonaga, 1997) ou chez des retrotransposons de type LINE chez les plantes (Ohta et al., 2002).

Une autre classe d'éléments identifiés dans la séquence promotrice d'EIN4 concerne des éléments de réponse à des stress biotiques ou abiotiques. De tels éléments sont : le motif GT-1 (GAAAAA), trouvé 4 fois, un site de reconnaissance des facteurs MYC et un des facteurs MYB. La présence de ces derniers éléments laisse supposé que l'expression de CcEIN4 pourrait être inductible.

La fonctionnalité de tous les éléments décrits ici n'est pas prouvée dans le cas de notre promoteur. Nous nous permettons de faire une analogie avec le gène LeETR5 de la tomate dont il est le plus proche. Bien que la spécificité de ce promoteur n'ait pas été étudiée en détail et qu'une comparaison de séquence ne soit pas possible, il est intéressant de noter que ce gène est plus exprimé dans les fleurs et dans les fruits que dans les organes végétatifs. Aucune étude n'a été faite sur sa réponse aux stress mais il est aussi plus exprimé au niveau des racines, organe souvent stressé du fait du milieu hostile dans lequel il se développe (Tieman et Klee, 1999)

C.- Le gène ETR2 chez les caféiers

1. CcETR2. Un gène de structure simple et conservée, hautement exprimé pendant la maturation des grains de café

Le troisième gène de récepteur d'éthylène que nous avons étudié chez les caféiers, est CcETR2. La séquence d'ADNc pleine longueur, isolée à partir



de la banque de fruit de C. canephora a une similarité très forte avec les gènes correspondants isolés chez les Solanacées.

L'analyse de la séquence génomique chez plusieurs espèces du genre Coffea, montre une structure conservée avec un seul intron lui-même très peu polymorphe. Ce polymorphisme réduit n'a pas permis d'en faire la cartographie sur les cartes génétiques disponibles. Celle-ci pourrait cependant être entreprise par une approche SNP. La comparaison de la séquence de CcETR2 avec le LeETR4 chez la tomate indique une forte homologie et suggère qu'ils dérivent probablement d'un ancêtre commun. Tout comme pour ETR1, la très bonne conservation de ce gène parmi les espèces que nous avons analysées, indique sans doute l'importance de la fonction qu'il contrôle.

Au niveau de son expression, ce gène est différent de ceux d'autres récepteurs identifiés chez les caféiers. Son niveau d'expression diminue au troisième stade (comme pour CcETR1 et CcEIN4), puis il remonte de manière significative au dernier stade de maturation, c'est-à-dire pendant la crise climactérique. Ce récepteur est le meilleur candidat pour assurer la transmission du signal de l'éthylène pendant cette phase pour activer les gènes des facteurs de transcription de type AP2/ERF qui à leur tour activent les gènes de la maturation du fruit

Chez la tomate, l'expression de LeETR4 est induite par l'infection par des pathogènes (Ciardi et al., 2000). L'homologue de CcETR2 chez C. arabica a été identifié dans une banque soustraite entre arbres sains et infectés par Hemileia vastatrix, l'agent de la rouille orangée. Il est possible que ce récepteur soit impliqué dans la réponse aux attaques de pathogènes chez les caféiers

D.- Les gènes de facteurs de Transcription de type AP2/ERF isolés chez les caféiers

1. CcERF2 est hautement exprimé pendant la maturation du fruit

C'est un peu par hasard que le gène codant pour le facteur de transcription CcERF2 a été isolé pendant le criblage de la banque d'ADNc de fruit de C. canephora alors que nous essayions d'isoler CcETR1. La similitude de séquence n'est pas très bonne, environ 33% d'identité entre les deux ADNc, ce qui est peine au-dessus de la similitude aléatoire ?.



Dans l'article publié au cours de cette thèse (Bustamante et al., 2005), nous avons montré la similitude d'ERF2 avec d'autres ADNc de facteurs de transcription agissant dans la graine (Fagus silvatica) ou dans les fruits (S. lycopersicum et Prunus armeniaca) ou encore qui sont impliqués dans la différentiation cellulaire (S. tuberosum).

LeERF2 est plus fortement exprimé dans les fruit mûrs de tomate (Tournier et al., 2003). Dans notre étude, nous avons montré qu'ERF2 chez PSE et chez CAN est aussi fortement exprimé pendant la maturation du fruit, c'est-à-dire, pendant la crise climactérique.

Dans sa région N-terminale le polypeptide prédit CcERF2, possède la boîte MCGGAII/L. Cette boîte, est conservée chez LeERF2;, il est donc fortement probable que CcERF2 appartienne au groupe VII décrit par Nakano et al., (2006). Les membres de ce groupe sont clairement différencié dans l'arbre phylogénétique montré par Bustamante et al., (2005). Les facteurs de transcription de ce sous-groupe sont impliqués dans la cascade de transduction déclanchée par l'éthylène (peut être en relation avec d'autres signaux) qui finalement induit l'expression d'autres gènes impliqués dans le processus de différentiation cellulaire, la maturation des fruits ou le développement de la graine. L'interaction avec d'autres signaux est très probable car Tournier et al., (2003) indiquent que l'expression du gène LeERF2 n'est pas affectée par l'éthylène. Une analyse détaillée du promoteur, de ce gène apporterait sans aucun doute de précieuses informations pour la compréhension de son mode de régulation.

2. CcERF1, un gène induit par des stress?

Le facteur de transcription CcERF1 est similaire au « facteur de réponse au stress » de la tomate (Tomato Stress-responsive factor). Ces deux facteurs appartiennent au même sous-groupe IX défini par Nakano et al., (2006) et possèdent des domaines conservés qui ont été décrits dans le facteur ERF1 d'Arabidopsis, et dans Pti5 de la tomate. Les gènes de ces facteurs de transcription sont activés par les attaques de pathogènes.

Dans la région promotrice du gène de ce facteur on trouve en particulier une boîte GCC, ce qui laisse supposer qu'il pourrait être activé par d'autres facteurs de transcription du type AP2/ERF. D'autres boîtes, trouvées dans les



promoteurs de gènes activés par des attaques de pathogènes, se trouvent aussi dans sa région promotrice. De même, dans cette région des éléments cis impliqués dans la réponse induite par des stress environnementaux de types anaérobie ou basse température. La présence de tous ces éléments cis laisse penser que l'expression de CcERF1 est sans doute induite en particulier par les stress.

E.- Transformation génétique

1. Transformation avec les constructions géniques en orientation anti-sens

Il s'agit ici de discuter des résultats préliminaires pour lesquels encore de nombreuses vérifications moléculaires sont nécessaires. Cependant comme un phénotype particulier a été observé pour toutes les lignées pouvant pousser sur un milieu contenant l'agent de sélection, il nous a paru intéressant de le relater.

Des lignées T2 d'Arabidopsis n'ont été obtenues que pour les constructions anti-sens de CcETR1 et de CcEIN4. Toutes les lignés T2 résistantes à l'hygromycine, montrent différents degrés de tolérance à la salinité (tableau 5).

Zhao et Schaller, (2004) ont montré que chez Arabidopsis, l'expression d'ETR1 diminue en présence de NaCl.

Les récepteurs d'éthylène fonctionnent comme des régulateurs négatifs de la cascade de transduction du signal éthylène. Une diminution du nombre de molécules de récepteur provoquée par le « silencing » du gène correspondant, peut sensibiliser la plante à répondre à de faibles quantités d'éthylène. Dans de telles conditions, de molécules de CTR1 pourraient se débloquer ce qui activerait la synthèse du régulateur membranaire positif EIN2 et plus bas dans la cascade, celle des facteurs de transcription EIN3 et « EIN3 like » qui eux-mêmes activent des gènes d'autres facteurs de transcriptions de type DRE ou AP2 qui contrôlent des gènes de réponse aux stress et en particulier à la salinité. Toute cette cascade d'événements



expliquerait pourquoi le phénotype de tolérance à la salinité est observé chez de telles plantes transformées. La construction anti-sens EIN4 serait plus efficace dans sa capacité à éteindre l'expression du gène correspondant, et peut-être celle d'autre membre de la famille des récepteurs à Histidine kinase, que la construction anti-sens ETR1. En fait on se trouverait dans une situation équivalente à celles des mutants « loss of function ». Nous avons utilisé dans ces expériences de « silencing » la séquence pleine longueur des ADNc, ce qui pourrait altérer le fonctionnement d'autres gènes présentant une certaine similitude de séquence mais aucun phénotype évident de déficience, ou de quelconque aberration, n'a été observée chez ces plantes.

2. Transformation avec les constructions géniques en orientation sens

Des plantes transgéniques T2 d'Arabidopsis sélectionnées sur hygromycine et qui ont été transformées avec des constructions sens des gènes CcETR1 ou CcEIN4 perdent l'orientation verticale lorsqu'elles poussent à l'obscurité et se comportent comme des plantes qui ne synthétisent pas d'éthylène ou qui sont insensibles à de faible dose de cette hormone. Golan et al. (1996) ont montré que le mutant insensible à l'éthylène ein2, montre à l'obscurité un phénotype similaire mais moins prononcé. Le même phénotype est observé sur des plantules éclairées par de la lumière rouge (Liscum and Hangarter, 1993). Dans ces conditions de lumière rouge, les plantules de petit pois produisent moins d'éthylène (Steed et al., 2004).

Ces résultats nous permettent de penser qu'à l'obscurité les plantules d'Arabidopsis qui sur-expriment les gènes des récepteurs d'éthylène CcETR1 ou CcEIN4 bloquent tout ou partie de la cascade de transduction du signal éthylène. Ce blocage pourrait s'expliquer par un fort déséquilibre stœchiométrique entre les molécules d'éthylène, de récepteur et de CTR1 présentes dans la cellule. La surexpression de CcETR1 conduisent à une surabondance de récepteurs d'éthylène, qui se trouveraient bien plus nombreux que les molécules d'éthylène présentes du fait d'une synthèse résiduelle. Ce grand nombre de récepteurs n'ayant pas fixé d'éthylène entraîne la présence d'un grand nombre de CTR1 dans leur état actif. Ce grand nombre



de molécule de régulateur négatif bloquerait toutes les molécules EIN2 présentes et donc le reste de la cascade. Le peu de CTR1 désactivés par la fixation de quelques molécules d'éthylène, ne suffiraient pas à amorcer la cascade à cause du trop grand nombre de CTR1 actifs qui produisent un effet contraire. Il en résulte donc un phénotype équivalent à celui montré par des plantes insensibles à l'éthylène à l'obscurité. En présence d'ACC dans le milieu, ce phénotype disparaît ce qui va dans le sens de notre hypothèse, car en présence d'ACC la synthèse d'éthylène augmente et il devient alors possible à cette hormone de se fixer sur les sites de récepteurs présents et donc entraîner la désactivation des CTR1 ce qui rend de nouveau la cascade de transduction active.

Même si nous n'avons pas encore de preuves moléculaires de la surproduction de récepteur dans nos plantes transgéniques, le fait qu'une dizaine de lignées indépendantes, résultant donc d'évènements de transformation indépendants, montrent le même phénotype et aient le même comportement en présence d'ACC, nous laisse croire que ces protéines sont bien suraccumulées dans ces plantes.

3. Surexpression des gènes de récepteur d'éthylène dans N. tabacum

Comme pour Arabidopsis, nous n'avons pas de données moléculaires concernant des plantes de tabac transgéniques transformées avec CcETR1. Des plantes T1 de N. tabaccum ont été produites très peu de temps avant la soutenance et ont fleuri durant la rédaction de ce manuscrit. Nous pensons que dans cette situation aussi le phénotype observé sur plusieurs plantes obtenues indépendamment est assez intéressant pour être commenté.

Toutes les plantes de tabac sélectionnées sur hygromycine, l'agent de sélection utilisé pour ces transformations, et transformées avec CcETR1 en orientation sens, sont mâles stériles. En effet leurs fleurs ne possèdent pas d'étamines.

Il n'est pas facile d'expliquer le mode d'action du produit du transgène, en l'occurrence le récepteur ETR1. La séquence codante est sous le contrôle du promoteur 35S, elle est supposée donc être exprimée constitutivement. Comme pour Arabidopsis surexprimant CcETR1, les plantes transgéniques de



tabac surexprimant ce même gène se comporteraient comme des mutants insensibles à l'éthylène. Au moment du développement des étamines, cette insensibilité bloquerait la transmission du signal éthylène dans la cascade de transduction. Ce blocage perturberait la transcription d'autres gènes, comme ceux des récepteurs de cytokinines ou de gibbérellines bloquant ainsi le développement normal des étamines.

La transformation de plants avec le gène muté d'Arabidopsis etr1-1 confère d'insensibilité dominant à l'éthylène (Wilkinson et al., 1997; Knoester et al., 1998). Ces derniers auteurs, ont transformé le tabc, en utilisant la séquence génomique d'etr1-1 avec son promoteur. Ces transformants ne montrent pas de fleurs anormales. Le gène CmERS1/H70 muté, qui induit l'insensibilité à l'éthylène, a été introduit chez le tabac sous le contrôle du promoteur 35S du CaMV. Les plantes transformées produisent moins de pollen et présentent des anormalités au cours du développement des gamètes mâles (Takada et al., 2006). Notre travail représente la première évidence de l'absence complète d'étamines dans des fleurs de tabac qui surexpriment un gène de récepteur d'éthylène. Il reste cependant nécessaire de compléter ces analyses car l'hypothèse que l'absence d'étamines puissent être du à la sélection des graines transformées sur hygromycine ne peut être totalement écartée.

PERSPECTIVES

Après avoir caractérisé moléculairement les gènes de trois récepteurs d'éthylène chez C. canephora, nous en avons analysé la diversité génétique dans différentes espèces représentatives du genre Coffea. Bien entendu cette caractérisation doit être achevée, en particulier en ce qui concerne les séquences promotrices dont l'analyse in silico doit être compléter par une analyse in vivo. Pour compléter l'étude des modes de régulation de l'expression de ces gènes, en particulier de CcETR1, une étude plus détaillée du rôle des séquences régulatrices potentielles (5'uORF avec sont intron, 5ème intron, sites alternatifs de polyadénilation, épissage alternatif) pourrait être entreprise.

Les études d'expression de ces différents gènes, incluant ERF1 et ERF2, en particulier dans des conditions différentes.

Un projet ANR basé sur la construction d'une puce ADN en collaboration avec Nestlé a été accepté et devrait commencer courant 2007. Cette puce contenant environ 13.000 unigènes de café, sera utilisée, entre autres, avec des cibles provenant de différents tissus du fruit et de la graine (endosperme, périsperme, péricarpe), y surveiller l'expression des gènes de récepteurs et de ceux dont l'expression est dépendante, sera bien évidement d'un grand intérêt.

Nous cherchions à savoir si ce type de fonction pouvait être lié à des caractères intervenants dans la détermination de la qualité à la tasse du café. La possible relation d'un des récepteur étudié, ETR1, avec des caractères agronomiques comme le temps de fructification, le poids de 100 grains la teneur en caféine et en acides hydroxycinnamiques ou acides chlorogéniques, a été mise en évidence mais celle-ci doit être affiné. En particulier il faut savoir si c'est le gène lui même qui est impliqué dans cette différence ou s'il n'est qu'un marqueur d'une région génomique qui contient à proximité d'ETR1 un (ou des) autre gène qui lui intervient sur ces caractères. La cartographie génétique est donc à préciser, sur la carte PSE-DEW, car certains QTL y ont été définis, mais face aux difficultés rencontrées pour renouveler le matériel végétal, il serait bon aussi de placer ce gène, et les autres aussi, sur une carte consensus associant un maximum de marqueurs et de QTL. Une telle carte









pourrait être proposée par le réseau international « International Coffee Genome Network » (ICGN) qui vient de se mettre en place. Il sera utile d'établir si ces gènes peuvent servir, et avec quelle confiance, de marqueurs dans des programmes d'amélioration utilisant la sélection assistée par marqueurs.

La cartographie physique du gène CcEIN4 a été débutée, il serait intéressant de connaître le voisinage immédiat de ce gène, en effet les résultats préliminaires montrent qu'il s'agit d'une région riche en séquences potentiellement codantes et que des relations fonctionnelles, comme avec le gène CcERF1, peuvent être identifié. Ayant accès à la banque BAC du Cirad, ce travail devra être répété pour les autres gènes décrits dans cette thèse. Cette cartographie physique permettra également de confirmer l'intégralité des séquences dont nous disposons surtout pour les régions 5' et 3'.

Nous avons tenté de faire une étude de complémentation fonctionnelle du triple mutant d'Arabidopsis « triple loss of function » muté aux gènes Atetr1, Atetr2 et Atein4 par les gènes de nos trois récepteurs. Malheureusement, les graines que nous avons reçues de M. Meyerowitz n'étaient pas celles du triple mutant rendant cette étude impossible. Nous avons du nous rendre à cette évidence, confirmée par les collaborateurs de Meyerowitz, qu'après plus de trois mois d'efforts et d'incompréhension. Quoi qu'il en soit, s'il est possible d'avoir accès à ce triple mutant cette étude devrait être entreprise, afin de confirmer sans ambiguïté les fonctions des produits codés par nos gènes.

Les expériences de transformations n'ont fait que débuter, en particulier plusieurs constructions géniques, incluant des gènes rapporteurs sous le contrôle des promoteurs isolés durant ce travail, ont été introduites dans la tomate (S. lycopersicum var Money Maker et Wva106). Ces plantes viennent juste d'être produites et aucune analyse n'a pu encore être entreprise sauf des PCR de vérification de présence des transgènes. Ces plantes donneront une première indication des spécificités spatio-temporelles des promoteurs utilisés. De même les plantes transgéniques de tabac et de tomate contenant les gènes de récepteurs eux-mêmes en orientation sens ou antisens doivent être analysées plus en détails. La photo de la page opposée montre ces tomates transgéniques obtenues en collaboration avec le laboratoire de Génétique et amélioration des Fruits et des légumes de l'INRA Avignon.



PUBLICATIONS

Isolation and characterization of a Coffea canephora ERF-like cDNA

Short Communication

Isolation and characterization of a *Coffea canephora* ERF-like cDNA

José Bustamante-Porras¹, Michel Noirot², Claudine Campa², Serge Hamon² and Alexandre de Kochko²*

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Bramón, Rubio, Táchira, Venezuela. ²Centre IRD, 911 Avenue Agropolis B.P. 5045, 34032 Montpellier Cedex 1, France.

Accepted 26 November, 2004

ERFs (Ethylene-Responsive Element Binding Factors) are members of a transcription factors family unique to plants. They contain a well-conserved segment, which interacts specifically with sequences containing AGCCGCC motifs (GCC box) located in the promoter region of genes activated during biotic or environmental stress in plants. A cDNA corresponding to an ERF gene has been isolated from a *Coffea canephora* fruit cDNA library. The cDNA was 1,317 nucleotides long and has an open reading frame of 987 bp. The predicted polypeptide showed a great similitude with equivalent proteins from others plant species. The binding domain shows 98.3% identity in amino acids sequence with *Lycopersicon esculentum* ERF. This transcription factor may possibly be involved in differential cell growth or in fruit ripening process. Although it was not possible to isolate it from a leaf cDNA library, its presence in such library was confirmed.

Key words: Ethylene, coffee, *Coffea canephora*, transcription factor, ERF.

INTRODUCTION

Many plant genes are transcriptionally regulated to respond to pathogen attacks or environmental stresses. Several signaling molecules, such as salicylic acid (SA), ethylene (ET), and jasmonic acid (JA) have been shown to be important components of defense response pathways (Glazebrook, 2001). These regulated pathways require the coordination of highly specific DNA-protein and protein-protein interactions.

A family of five membrane-localized receptors (ETR1, ERS1, ETR2, ERS2 and EIN4) recognizes ethylene, which is synthesized from S-adenosyl-L-Methionine and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC). Other receptors include the CTR1, EIN2, EIN3 and finally the ERFs (Chang and Shockey, 1999; Stepanova and Ecker, 2000; Wang et al., 2002).

Degenerated primers (forward 5'-GGGTXCTYRTXCA RTTYGGYGC-3' and reverse 5'-GGCATCCAHARXGC RCAYTC-3') were deduced from conserved regions



ERF proteins are members of the AP2/ERF family of transcription factor. They have been divided in two subfamilies based on the number of AP2/ERF domains (Riechmann and Meyerowitz, 1998): The AP2 type like APETALA2 (AP2) (Jofuku et al., 1994) and the ERF type (Ohme-Tagaki and Shinski, 1995). The first one has two DNA-binding domains whereas the ERF type contains only one. This DNA-binding domain, highly conserved, specifically with sequences AGCCGCC motifs (GCC box) (Hao et al., 1998). ERF proteins are mainly expressed during biotic or abiotic stresses (reviewed in Wang et al., 2002). The ERF1 expression is synergistically activated by ethylene and jasmonate (Lorenzo et al., 2003). The isolation of a cDNA corresponding to a gene encoding an ERF-like transcription factor from Coffea canephora is described

^{*}Corresponding autor. E-mail: dekochko@mpl.ird.fr. Tel.: +33-4-67416311. Fax: +33-4-67416222.

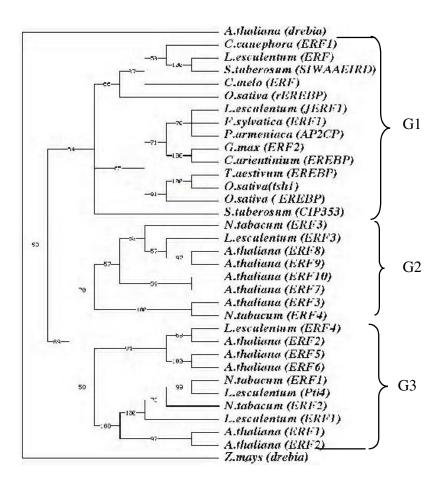


Figure 1. Phylogenetic relationship of the *Coffea canephora* ERF to various others plants ERF. The phylogenetic tree was constructed from an optimal alignment of proteins using Clustal W. GeneBank accession number were: *A. thaliana* (DREB1: BAA33791), At ERF1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 (O80337, O80338, O80339, O80340, O80341, NP_567529, BAA96653, BAB16084, BAB18560, BAB18561); *N. tabacum*: NtERF1, 2, 3, 4 (BAA07321, BAA07324, BAA07322, BAA07323); *L. esculentum*: LeERF, 1, 3, 4 (AAO34704, AAO34705, AAO34705, AAO34706), JERF1 (AAK95687), Pti4 (AAC50047); *S. tuberosum*: STWAAEIRD (AAC29516), CIP353 (BAC56862); *O. sativa*: EREBP (AAK92632), rEREBP (AAP56251), TSH1 (AAF05606); *C. arientinum* EREBP (CAD56217); *F. silvatica* EREBP1 (CAD21849); *C. melo* CmERF2 (BAD01556); *P. armeniaca* AP2DCP (AAC24587); *G. max* EREBP (AAQ10777); *T. aestivum* TaERF2 (AAP32468). *A thaliana* (dreb1a) and *Z. mays* (dreb) are ERF/AP2 related proteins, but from the DREB subfamily. They are in the cluster for showing the diversity of these family genes.

previously identified in ethylene receptors of different plant species. Using these primers, a segment of 400 bp was amplified from *C. pseudozanguebariae* nuclear DNA. This amplified fragment after random-prime labelling (Prime-a-Gene® Labeling System kit (Promega)) with α^{32} P[dCTP], was directly used as a probe for screening a *C. canephora* cDNA library obtained from fruits harvested at different ripening stages (ZAP Express® -cDNA GigapackII gold cloning kit (Stratagene)).

RESULTS AND DISCUSSION

A full-length CoERF cDNA (Gene Bank Accession No AY522505) was isolated. It is 1,317 nucleotides long and

contains an open reading frame of 987 bp. The predicted polypeptide has 329 amino acids (39 Strongly Basic (+), 42 Strongly Acidic (-), 93 Hydrophobic and 99 Polar Amino Acids. It has a molecular mass of 36.34 kDa and an isoelectric point of 6.5. It shows very significant similitude with other equivalent genes previously isolated. The protein has a conserved DNA *G-Binding Domain* or GBD of 59 amino acids. This GBD domain which is 99.39% identical to a *Lycopersicon esculentum* ERF, has conserved secondary structure elements consisting of three β -sheet strands, responsible for binding DNA (Allen et al., 1998) and one α -helix.

The phylogenetic relationship of *Coffea* ERF to a panel of others plants ERF showed three major groups (Figure 1). G1 group includes the *Coffea* cDNA described here.



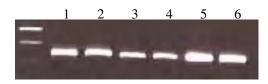


Figure 2. PCR with specific primers in *C. canephora* cDNA fruits libraries (1, 2), cDNA leaves library (3, 4) and *C. pseudozanguebariae* genomic DNA (5, 6).

ERF genes are often expressed during biotic or environmental stresses, nevertheless some cDNAs including those from G1 were isolated in cell suspensions (*S. tuberosum*: AAC29516), seeds (*F. sylvatica*: CAD21849) and fruits (*L. esculentum*: AAO34703, *P. armeniaca*: AAC24587 and *C. canephora*) (reported here)). In tomato, LeERF transcripts were most abundant in ripening fruit (Tournier et al., 2003). In rice, the *OsEBP-89* (Sequence CAC83122) was expressed at high levels in the developing endosperm (Yang et al., 2002). Such homologies suggest that the *Coffea* ERF may possibly be involved in differential cell growth or in the ripening process. Moreover, these genes, clustered in G1, are involved in one of the two processes described above, but not in plant defense.

To determine the expression of the *Coffea* ERF, a PCR with specific primers (Forward: GGGGGATCAGGCAGC GACC, and Reverse: CATGAAGGACTCATAGGCCAGC) were prepared. A fragment was amplified in two *C. canephora* libraries (fruits and leaves) and *C. pseudozanguebariae* nuclear DNA. Figure 2 shows that this ERF is possibly more expressed in fruits than in leaves. In addition, the PCR product obtained from *C. pseudozanguebariae* nuclear DNA has the same size, suggesting the lack of introns in this gene segment (bases 312-904). This *Coffea* ERF sequence has a highly conserved N-terminal motif (MCGGAII/L); identical to all genes clustered in the same group.

Transcription of corresponding genes LeERF (AAO34704) and STWAAEIRD (AAC29516) from tomato and potato respectively, were not affected by ethylene (Tournier et al., 2003; Campbell et al., 1998). These two sequences clustered in the G1 group (Figure 1). Despite its close relationship and phylogenetic link, the possible role of *C. canephora* ERF gene in fruit ripening and/or cell growth needs to be confirmed.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank FONACIT and INIA, Venezuela, for doctoral scholarship to Mr. J. Bustamante

REFERENCES

- Allen MD, Yamasaki K, Ohme-Takagi M, Tateno M, Suzuki M (1998). A novel mode of DNA recognition by a beta-sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA. EMBO J. 17: 5484–5496.
- Campbell MA, Woodring A, Stidd J (1998). Isolation of a cDNA from potato with structural similarity to the AP2 gene superfamily. Plant Physiol. 117: 1127.
- Chang C, Shockey JA (1999). The ethylene-response pathway: signal perception to gene regulation. Curr. Opin. Plant. Biol. 2: 352-358.
- Glazebrook J (2001). Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis-2001 status. Curr. Opin. Plant. Biol. 4: 301-308.
- Hao D, Ohme-Takagi M, Sarai A (1998). Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of ethylene-responsive element-binding factor (ERF domain) in plant. J. Biol. Chem. 273: 26857-26861.
- Jofuku KD, Den Boer BG, Van Montagu M., Okamuro, JK (1994). Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. Plant Cell 6: 1211–1225.
- Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano JJ, Solano R (2003). ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. Plant Cell 15: 165–178.
- Ohme-Takagi M, Shinshi H (1995). Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. Plant Cell 7: 173–182.
- Riechmann JL, Meyerowitz EM (1998). The AP2/EREBP family of plant transcription factors. Biol. Chem. 379: 633–646.
- Stepanova AN, Ecker JR (2000). Ethylene signalling: From mutants to molecules. Curr. Opin. Plant. Biol. 3: 353–360.
- Tournier B, Sanchez-Ballesta MT, Jones B, Pesquet E, Regad F, Latché A, Pech JC, Bouzayen M (2003). New members of the tomato ERF family show specific expression pattern and diverse DNA-binding capacity to the GCC box element. FEBS Letters 550: 149-154
- Wang K, Li H, Ecker JR (2002). Ethylene biosynthesis and signaling networks. Plant Cell 14: S131-S151.
- Yang HJ, Shen H, Chen L, Xing YY, Wang ZY, Zhang JL, Hong MM (2002). The OsEBP89 gene of rice encodes a putative transcription factor and is temporally expressed in developing endosperm and intercalary meristem. Plant Mol. Biol. 50: 379-391.



Molecular Characterization of an Ethylene Receptor gene (CcETR1) in coffee trees. Its relationship with fruit development and caffeine content.



The nucleotide sequences data reported here are available in the DDBJ/EMBL/GenBank databases under the following Accession Nos.

EF107672, EF107673, EF107674, EF107675, EF107676, EF107677, EF107678, EF107679, EF107680, EF107681, EF107682, EF107683, EF107684, EF107685, EF107686, EF107687



Abstract

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

Three full-length cDNAs corresponding to a putative ethylene receptor gene (ETR1) were isolated from Coffea canephora cDNA libraries. They had an identical 5'UTR, but differed in the size of their 3'UTR. These cDNAs contained a main ORF and a 5'UTR short ORF putatively encoding a small polypeptide. The CcETR1 gene, present as a single copy in the C. canephora genome, contained five introns in the coding region and one in its 5'UTR. Gene expression studies in C. canephora and C. pseudozanguebariae showed that the fifth intron can be alternatively spliced, leading to a truncated polypeptide. C. pseudozanguebariae ETR1 transcripts showed various forms of splicing alterations. This gene was equally expressed at all stages of fruit development; however, splicing alterations could indicate posttranscriptional regulation. A segregation study on an inter specific progeny showed that ETR1 is related to the fructification time, caffeine content of the green beans and the weight of the seeds. Arabidopsis transformed etiolated seedlings over-expressing CcETR1 displayed highly reduced gravitropism, but the normal triple response was observed in an ethylene enriched environment. Such transformed plants behaved like a low concentration ethylene insensitive mutant confirming the receptor function of the protein encoded by the *CcETR1* gene.

3940

Keywords: coffee, ethylene receptors, caffeine content, fruit ripening, intron splicing, overexpression.

42

43

44

45

46

47

48

49

50

41

Introduction

The phytohormone ethylene plays a central role in physiological and developmental processes such as germination, growth, flower initiation, leaf and flower senescence, organ abscission and fruit ripening (Abeles et al. 1992). It is also a major signalling molecule mediating responses to a range of both biotic and abiotic stresses. Ethylene has been shown to induce the transcription of a wide range of genes involved in wound signalling (O'Donnell et al. 1996) and defense mechanisms against pathogens (Bleecker and Kende 2000).



Several receptors that can mediate ethylene perception have been already described. In Arabidopsis, a family of five receptors has been isolated: ETR1, ERS1, ETR2, ERS2, and EIN4 (Guo and Ecker 2004). All ethylene receptors act through interaction with the Constitutive triple response1 protein (CTR1), which is homologous to the Raf family of Ser/Thr kinases and negatively regulates ethylene signalling. In absence of ethylene, the receptors are thought to maintain the N-terminus portion of the CTR1 protein in such a conformation that CTR1 is active and able to repress downstream ethylene responses. When ethylene binds on the receptors, the CTR1 conformation changes and inhibits its kinase activity, thereby triggering repression of downstream ethylene responses (Kieber et al. 1993; Huang et al. 2003). The remainder of the cascade involves the EIN2 protein and transcription factors such as EIN3 and ERF1.

The structure of the ethylene receptor ETR1 is modular. The N-terminal portion contains three predicted trans-membrane segments and functions as a signal input domain based on its ability to bind ethylene (Schaller et al. 1995). The functional unit of the receptor is a disulfide-linked dimer forming a single ethylene-binding site (Rodriguez et al. 1999). The dimerization is mediated by two Cysteine residues located near the N terminus (Schaller et al. 1995). The trans-membrane segments are also involved in localizing the receptor in the endoplasmic reticulum (ER), an unusual location for a hormone receptor but compatible with the diffusion of ethylene in aqueous and lipid environments (Chen et al. 2002). Following the trans-membrane segments, ETR1 contains a GAF domain whose function is still unknown. In its carboxyterminal half, ETR1 contains regions that are homologous to histidine kinases, and the receiver domains of response regulators (Chang et al. 1993), signalling elements



that were originally identified as parts of bacterial two-component systems (Parkinson 1993).

A regulator of ETR1 ethylene receptor function has recently been identified in tomato and Arabidopsis (Barry and Giovannoni 2006; Resnick et al. 2006). The encoding gene controls a predicted trans-membrane protein which is highly conserved in plants and protists but absent in fungi and prokaryotes. In Arabidopsis, this gene was named reversion to ethylene sensitivity (*RTE1*) (Resnick et al. 2006). The corresponding gene in tomato was named *GREEN RIPE (GR)*. The non-ripening phenotype of the dominant Green-ripe (Gr) and Never-ripe 2 (Nr-2) mutants is caused by a deletion in the *green ripe (GR)* gene 5'UTR, which causes ethylene insensitivity (Barry and Giovannoni 2006).

Loss-of-function and hypomorphic mutant alleles of the receptors have been isolated and characterized for their effects on ethylene signal transduction. A functional overlap was observed among ethylene mutants. Indeed, single loss-of-function mutations had little or no effect upon ethylene signal transduction. However, triple loss-of-function mutants like the *etr1;etr2;ein4* Arabidopsis mutant displayed constitutive ethylene-response growth phenotype in the dark (Hua and Meyerowitz 1998). This phenotype was obtained because the receptors belonging to the two remaining families (ERS1 and ERS2) were insufficient to complement ethylene responses.

The coffee cherry is a climacteric fruit—its ethylene production increases during ripening (Pereira et al. 2005)—and coffee tree species present great differences in fruit ripening time. In *Coffea pseudozanguebariae* (PSE), a wild East African species, the fruit ripens nine weeks after anthesis, while in other species this process lasts much longer, generally about 35 to 37 weeks (Hamon et al. 1984). A major QTL related to



fructification time was mapped on the interspecific [(*C. pseudozanguebariae* x *C. dewevrei*) x *C. dewevrei*] genetic map. This QTL was related to caffeine content of green coffee beans (Akaffou et al. 2003). Although ethylene is known to be involved in coffee fruit maturation, nothing is known about the role it plays or its control at the receptor level.

Some ethylene receptors play a more important role in fruit ripening than others. In melon, co-location of an ethylene receptor encoding gene and a QTL related to fruit climacteric characteristic has been demonstrated (Perin et al. 2002). In transgenic tomato with reduced *LeETR4* or *LeETR6* expression the onset of ripening is advanced by up to ten days, while increased Never Ripe gene (NR) expression delays the onset of ripening by several days (Klee, 2006). RT-PCR analysis showed that *LeETR1* and *LeETR2* are expressed at constant levels in all tissues throughout development (Lashbrook et al. 1998) and no altered expression was observed in response to any external stimulus such as ethylene or pathogen infection (Klee 2002).

In this article, we present the first isolation and characterization of an ethylene receptor encoding gene in coffee plants (*CcETR1*). Because of the complex gene structure observed, different levels of gene expression regulation are discussed. Gene diversity and segregation analysis in the progeny of an interspecific back-cross were studied. Association with variations in several phenotypic traits was also surveyed.

Material and Methods

Plant material

Identification and characterisation of the ethylene receptor gene was carried out on *C. canephora* (BB62), *C. pseudozanguebariae* (H60), *C. dewevrei* (EB56),



C. arabica (var caturra), C. moloundou (OD68), C. eugenioides (DA78), C. sessiliflora (PA65) and C. heterocalyx (JC63). The trees were grown in a tropical green house at the IRD centre in Montpellier, France.

Segregation studies, phenotypic observation and biochemical analysis were performed on the interspecific progeny derived from the back-cross [(*C. pseudozanguebariae* x *C. dewevrei*) x *C. dewevrei*] described by Ky (2000) Intraspecific polymorphism was analysed on six genotypes of each progenitor species [(*C. pseudozanguebariae* and *C. dewevrei*)].

Plants of *Arabidopsis thaliana* (Columbia wild-type) were grown in soil: vermiculite (1:1) in a growth chamber under 16 h light photoperiod at 20°C up to flowering. To obtain more floral buds per plant, inflorescences were clipped after most plants had formed primary buds, synchronising emergence of multiple secondary buds.

Total DNA and RNA extraction

Leaf samples were collected and total DNA was immediately extracted using the DNeasy Plant Maxi kit® (Qiagen GmbH, Germany) following the manufacturer's instructions. For RNA extraction, samples were ground in liquid nitrogen and extraction buffer was added immediately to avoid thawing of the samples. The buffer consisted of 80% guanidine isothiocyanate (5 M) in 30 mM AcNa (pH 5.2), 4.4% sarcosine solution (20% w/v), 9% PVP (10% w/v), 4% ascorbic acid (0.5 M) and β-mercaptoethanol (3% v/v). After centrifugation at 4,800 rpm for 30 min at 4°C, 7 ml of supernatant were ultracentrifuged at 20°C for 20 h at 32.000 rpm (Beckman L7, SW41T1 rotor) in 3 ml of 5.7 M CsCl. Classical purification was then performed and RNA was resuspended in ultra-pure water and stored at -80°C. Yield and purity were determined by



spectrophotometry. RNA integrity was checked by electrophoresis on a 1% denaturing agarose gel followed by ethidium bromide staining.

Preparation of ethylene receptor gene-specific probes

149	For cDNA library screening, specific probes were generated by PCR using
150	degenerated primers designed on the N terminal conserved region after aligning ETR1
151	corresponding sequences available in international databases (nr). Forward: ETR1aF:
152	5'- GGGTXCTYRTXCARTTYGGYGC -3'; Reverse: ETR1aR: 5'-
153	GGCATCCAHARXGCRCAYTC -3'. The 400 bp amplification products of
154	C. canephora and C. pseudozanguebariae genomic DNA were cloned using the PCR®-
155	TOPO® cloning® kit (Invitrogen, The Netherlands) and sequenced (MWG-Biotech,
156	France). After confirmation of the fragment coding potentiality, cDNA libraries were
157	screened with these probes after radio-labelling with dCT ³² P using the Prime-a-Gene®
158	Labelling System kit (Promega).
159	For BAC library screening, and southern blot hybridization, specific probes
160	located in the fourth and fifth exon were generated using specific primers designed
161	according to the <i>C. canephora</i> genomic sequence: IETRcF 5'-
162	CCCCTTATCCATGGCTGATTG -3' and IETRcR 5'-
163	CATGATTTACAGGGGCTCTGG -3'

cDNA libraries construction and screening

Two C. canephora cDNA libraries were constructed, one from young leaves and the other from fruits at different stages of development and maturation, as described in Mahesh et al. (2006). Approximately 8.10⁵ plaques from amplified cDNA libraries were blotted on Hybond N⁺ membranes (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, USA) and screened twice with the ETR1 ³²P radiolabeled probe from C. pseudozanguebariae. Five



plasmids containing an insert corresponding to a potential full-length cDNA (as shown by PCR) were purified with alkaline lysis and sequenced (MWG-Biotech, France). Sequence similarities with publicly available sequences were explored using the Blastx program.

Amplification of full-length genes

Specific primers were designed from *C. canephora* ETR1 cDNA for PCR amplification of full-length genes in three species: *C. canephora*, *C. pseudozanguebariae* and *C. dewevrei* which differ in fruit ripening time, using genomic DNA as template. The intron located in the 5'UTR was amplified in four species: *C. moloundou*, *C. sessiliflora*, *C. racemosa* and *C. heterocalyx*.

C. canephora BAC library screening

A BAC library of *C. canephora*, genotype 126, representing nine haploid genome equivalents, was screened. High-density filters supporting the BAC library were kindly provided by CIRAD (Leroy et al. 2005).

Three high-density filters, representing the whole library, were pre-hybridized overnight in pre-hybridizing buffer (50 mM Tris, 10 mM EDTA, 5 X SSC, 1 X Denhardts; 0.2% SDS; 100 µg.ml⁻¹hearing sperm), followed by overnight hybridization with the 831 bp ³²P radiolabeled probe at 65°C in a buffer equivalent to the pre-hybridizing buffer added with 1 g.ml⁻¹ dextran sulphate. Subsequently, filters were briefly rinsed at room temperature with 2 X SSC; 0.5 % SDS, followed by two washes (20 min at 65°C) with 0.5 X SSC; 0.1 % SDS for the first wash and 0.1X SSC; 0.1 % SDS for the second. Filters were autoradiographied (Kodak BioMax Film) for 24 h.

Southern Blot



Genomic DNA (10 μg) of *C. canephora* and *C. dewevrei* were digested with *Eco* RV or *Dra* I (cut three and two times inside the gene respectively, but not inside the probe region). Fragments were separated on a 0.8% (w/v) agarose gel at 80 V for 4 h. The digested coffee genomic DNA was transferred onto a HybondTM-N+ membrane (Amersham Pharmacia Biotech, England) and hybridized with the 831 bp ³²P radiolabeled probe (Sambrook and Russell 2001).

Biochemical data, segregation study and statistical analysis

Caffeine content data have previously been evaluated on the [(*C. pseudozanguebariae* x *C. dewevrei*) x *C. dewevrei*] backcross progeny. Sample preparation, HPLC analysis and measurement of phenotypical traits are described in (Barre et al. 1998; Ky et al. 1999; Akaffou et al. 2003).

Segregation of parental alleles in the back-cross progeny was observed using PCR. PCR amplification was carried out on genomic DNA after identification of an indel polymorphism in the fifth intron of the ETR1 gene with the following primers: F5IETRF: 5'-CACGACGTTGTAAAACGACGTCTTATATGGCATTCGGTAAGAA-3'; and: 5IETRR: 5'- TCAAGGATAACAACAGGGGTAGAC-3'. PCR products were visualised on an IR2 automated DNA sequencer (LI-COR, model 4200L-2, Lincoln, Nebr.) as described in Poncet et al. (2004). Quantitative effects of *CcETR1* on caffeine content and some morphological characters were analysed using a one-way ANOVA with a fixed effect (Statistica Software Package, 5.1 version 1997 for Microsoft Windows).

RT-PCR analyses

Total RNA was isolated from two and four different fruit ripening stages of C. canephora and C. pseudozanguebariae respectively (from small green to red ripened



217	fruits). Two μg of total RNA were used to perform reverse transcription with the
218	$\hbox{``SuperScript}^{TM} \ First-Strand \ Synthesis \ System \ for \ RT-PCR" \ kit \ (Invitrogen, \ Carlsbad,$
219	USA). Subsequent PCR were carried out with 50 pg of each cDNA using specific
220	primers: IETRdF 5'-GTCCAGAGCCCCTGTAAATC-3' and IETReR 5'-
221	CAAAGCAGAATTATACTACACCATG-3' allowing the amplification of an expected
222	706 bp fragment. As positive control, a 400-bp fragment was amplified using specific
223	primers for β -actin: 5'-GCAGATGGTGAGGAGATTCAA-3' (F) and 5'-
224	GTCCAGCACAATACCAGTTGTACG-3' (R). The reactions were performed on a
225	PTC 200 thermocycler, starting with denaturation at 94° C for 5 min, followed by 34
226	cycles at 94° C for 1 min, at 55° C for 1 min, and at 72° C for 1 min. Samples were
227	collected every 3 cycles starting at the 25 th . The amplified DNA fragments were
228	separated by electrophoresis on 1.5% agarose gels at 100 V for 30 min and stained with
229	ethydium bromide.

Plasmid construction and plant transformation

230

239

240

231 Specific primers, including Hind III/Bam HI restriction sites, were designed to 232 the full length 5'amplify cDNA: HindETR1F: 233 CGCAAGCTTATGGAGTCCTGTAACTGCATTG -3' and BamHETR1R 234 CGCGGATCCTTATTGAGCCTCCAGCAGAAC 3'. The amplified product was first cloned in PCR®-TOPO® before being inserted in pCAMBIA 1300 under the control of 235 236 the Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) 35S promoter. The construct was verified by 237 restriction and sequencing before being electroporated into Agrobacterium tumefaciens 238 (strain GV3101) as described by Shaw (1995).

The *A. tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis* was performed as described by Clough and Bent (1998) with the following modifications: plants with



immature floral buds were dipped into a solution containing A. tumefaciens, 5% (w/v)		
sucrose and 0.05% (v/v) Silwet L-77 (Lehle Seeds, Round Rock, USA) for 15 seconds.		
T0 seeds were collected, dried at 37°C for three days and sown on 0.8% (w/v) plant-		
agar plates of $\frac{1}{2}$ MS basal medium, pH 5.65 (Murashige and Skoog 1962) with		
Gamborg's vitamins (Gamborg et al. 1968), and no added sugar but containing 50 μg		
mL^{-1} hygromycin B to select the transformants. Seeds were kept for 2 days at 4°C		
before being sown at 22°C under standard light regimes (100 μ mol m ⁻² s ⁻¹). Surviving		
T1 plantlets were transferred to soil after ten days and grown in soil under a 16-h-		
light/8-h-dark cycle at 20°C in plant growth chambers to set seeds (T2).		

Seedling Growth-Response Assays

To examine the seedlings' response to ethylene (Chen and Bleecker 1995; Gamble et al. 2002), seeds were grown on squared Petri dishes containing $\frac{1}{2}$ MS basal medium with Gamborg's vitamins (pH 5.65) and 0.8% (w/v) plant agar, supplemented or not, with 10 μ M 1-aminocyclopropane-1-carboxilic acid (ACC). After a cold treatment (2 days at 4°C), seedlings were germinated for four days in the dark at 20°C. Petri dishes were oriented vertically for seedling growth.

Results

1. CcETR1 gene characterisation

a. cDNA characterisation

Three full-length cDNAs corresponding to a *CcETR1* gene were isolated from the CAN fruit cDNA library. They were respectively 2,649 bp; 2,683 bp and 3,162 bp in length (see table 1 for the accession numbers of the sequences concerned). They all



contained a putative open reading frame of 2,223 bp translated *in silico* into a 740 amino acid polypeptide. The CcETR1 predicted polypeptide had a molecular weight of 82.48 kDa. All cDNA clones had the same 5'UTR size and sequence, but their 3'-UTR varied in length (313 bp, 347 bp and 826 bp). Up to four putative polyadenilation sites were found in these sequences depending on their length.

b. CcETR1 gene copy number

Only one band was observed on a DNA-DNA hybridization blot when the genomic DNA was digested by *Eco* RV or *Dra* I and hybridized with a specific probe (fig. 1). When the *C. canephora* BAC (X9) library was hybridized with the same probe, only seven spots were clearly identified. These results strongly suggest that *CcETR1* is present as a single copy in the CAN genome.

c. ETR1 gene polymorphism among Coffea species

ETR1 genomic sequences (from ATG to stop codon) were PCR amplified from three different *Coffea* species: *C. canephora, C. pseudozanguebariae* and *C. dewevrei* that differ in fructification time and caffeine content (1 genotype per species).

In the three *Coffea* species, the *ETR1* sequence contained five introns in its coding region (Fig. 2) in a similar position to those found in *ETR1* gene sequences in other plant species. Comparison of the *Coffea* intronic sequences showed high percentage similarity between the first four introns. The fifth intron was very polymorphic due to insertion/deletion (indels) as shown in Figure 3.

Additional PCR amplification of the 5th intron revealed polymorphism between five diploid *Coffea* species: *C. canephora*, *C. pseudozanguebariae*, *C. dewevrei*, *C. eugenioides*, *C. moloundou* and the tetraploid *C. arabica*. PCR amplifications produced a single band for all species except *C. arabica*, which showed a 2-band



pattern. The shortest *C. arabica* sequence (1079 pb) showed high similarity (99.1% identity) with the *C. canephora* sequence; whereas the longest fragment of 1186 pb was more similar to *C. eugenioides* and *C. moloundou* sequences (99.3% and 98.7%, respectively).

The *CcETR1* 5'UTR contained a short Open Reading Frame (ORF) putatively encoding a small polypeptide of 35 amino acids with no similarity to any known protein. This small polypeptide coding sequence was interrupted by a 978 bp long intron. This 5'UTR intron was also identified in *C. moloundou*, *C. sessiliflora*, *C. racemosa* and *C. heterocalyx* with a size of 981, 974, 979 and 981 bp respectively. Amplification was not possible for *C. pseudozanguebariae* and *C. dewevrei*. *C. canephora* intra specific variability of the 5'UTR intron was identified, as the *CcETR1* sequence from the BAC clone contained a 984 bp long intron.

2. RT-PCR analysis

a) Alternative and mis-splicing of ETR1 introns

In *C. canephora*, the fifth intron might be spliced in such a way that the resulting polypeptide lacks the receiver domain. In addition, two consensus polyadenylation sites were present within the fifth intron. Transcripts amplified from *C. pseudozanguebariae* showed splicing alterations that took five different forms (fig. 4) including: exon skipping, unspliced introns, alternative 5' splice donor site and alternative 3' splice acceptor site.

3- Expression "in planta"

a. ETR1 expression pattern



Semi-quantitative RT-PCR experiments showed that the *ETR1* gene was expressed at all stages of fruit development and maturation observed in *C. canephora* and *C. pseudozanguebariae* with no significant differences in the level of expression (fig. 5).

b. Effect of CcETR1 over-expression in Arabidopsis thaliana

Four-day old Arabidopsis transformed seedlings over-expressing *CcETR1* and grown in the dark without ethylene showed negative gravitropic growth (figure 6a). In presence of ethylene, they showed a normal triple response to ethylene (figure 6b); however, fully grown transformed plants had no obvious phenotypes compared to wild type plants.

c. Segregation analysis and effect on phenotypic traits

PCR amplification within the fifth intron showed different product sizes i.e. 469 bp and 532 bp for *C. pseudozanguebariae* and *C. dewevrei* respectively. Segregation analysis of these *ETR1* alleles in the backcross progeny [(*C. pseudozanguebariae* x *C. dewevrei*) x *C. dewevrei*] was associated with variations in agronomical traits such as fructification time, time of endosperm maturation and the 100 seeds weight (P100) (table 2). Presence of the *C. pseudozanguebariae* allele (P) in the genome of a heterozygous offspring (PD), unlike with a homozygote *C. dewevrei* - *C. dewevrei* (DD), is correlated with a significant reduction in the fructification cycle of 27.5 days (9.8%). Seventy seven percent of the reduction in fructification time could be explained by the reduction in the endosperm maturation period. On average, maturation of the endosperm in a heterozygote DP occurred 18 days prior to the homozygote DD. Interestingly, DP heterozygote plants also showed a reduction of 24.7% in the caffeine content in their grains



Discussion

In this study for the first time, we isolated and characterized the ethylene receptor gene in the *Coffea* genus that harbours climacteric plants. The *CcETR1* deduced amino acid sequence was 87.4% similar to that of *Petunia hybrida* (accession # AF145972). Its trans-membrane domain was highly conserved. It displayed 97.4% similarity with the N-terminal domain (positions 1 to 362) of *Prunus persica* (Bassett et al. 2002). The two cysteine residues responsible for formation of the intermolecular disulphite-linked dimer (Schaller et al. 1995) were identified in the CcETR1 AA sequence at the expected position (Cys4 and Cys6). Within the Histidine Kinase motif, a conserved Histidine that serves as a presumptive site for autophosphorylation (His-352) was also found (Gamble et al. 1998). All these features indicate that this protein has an ethylene receptor function.

We showed that the *CcETR1* gene is present as a single copy in the *C.* canephora genome. Genetic diversity of *ETR1* was observed when analysing the fifth intron sequence in different *Coffea* species that differ in fructification time. In *C.* canephora, the *CcETR1* structure displayed certain aspects that indicate complex regulation of its expression.

- i) Three independently isolated full-length cDNA clones had the same coding sequence and an identical 5'UTR. But they differed in the size of their 3'UTR suggesting that the only differences between these three clones are alternative polyadenilation sites.
- ii) The 5'UTR comprises a short putative open reading frame (uORF). This
 uORF is interrupted by one intron, which is conserved in some *Coffea* species.



iii) RT-PCR analyses of total RNA purified at different fruit development stages in CAN and PSE showed that the primary transcript issued resulting from the *CcETR1* transcription has different <u>types</u> of intron retention suggesting the presence of different alternative splicing sites or a deficient splicesome in the case of PSE.

ETR1 is a single gene

DNA blot and BAC library hybridization results, strongly suggest the presence of a single *ETR1* gene in the *C. canephora* genome. This was also strongly suggested in other diploid species by PCR patterns on genomic DNA with the amplification of a single band except for the allo-tetraploid *C. arabica*. Furthermore, segregation analyses within two interspecific back-cross progenies [(*C. canephora* x *C. heterocalyx*) x *C. canephora*] and [(*C. liberica* x *C. canephora*) x *C. canephora*] showed a typical pattern, i.e. a mono locus segregation in both back crosses. [Mapping on LD H and LD 2 respectively (Poncet et al, unpublished data)]. *ETR1* was also found as a single gene in other species for example in *Prunus persica* (Bassett et al. 2002) and melon (Sato-Nara et al. 1999). By contrast, in tomato, two probable paralogues were identified: *LeETR1* and *LeETR2*. (Lashbrook et al. 1998). At the sequence level, these genes are very similar (85% identity) and their structure is identical. *LeETR2* (accession AY600436) contains five introns on the coding region at the same position as *Arabidopsis* ETR1. Similarly, two *PcETR1* genes were identified in *Pyrus communis* (El-Sharkawy et al. 2003).

ETR1 is a conserved gene

Analysis of gene structure showed that the number and positions of the *ETR1* intron are well conserved in the *Coffea* species studied. An identical position was shown in the homologous *AtETR1* sequence in *Arabidopsis thaliana* (Chang et al. 1993) and



LeETR2 Exonic in Solanum lycopersicum. sequences of CcETR1 in C. pseudozanguebariae and those of CpETR1 and CdETR1 C. dewevrei, were highly homologous leading to very conserved deduced amino acid sequences. Similarly, introns 1 to 4 were also highly conserved. Only the fifth intron displayed some differences mainly as insertions/deletions (indels). However, the presence of 5'UTR intron was demonstrated in only some of the species observed. The amplification of this intron was not possible in other wild coffee species such as C. pseudozanguebariae and C. dewevrei. This lack of amplification could be due to insufficient similarity between the primer sequences and the corresponding genomic region in these species. Primers were designed according to the CcETR1 sequence; in the first exon of the small 5'UTR polypeptide (forward) and in the first exon ETR1coding region (reverse). Absence of the 5'UTR small polypeptide sequence in some Coffea species may also explain the lack of amplification.

CcETR1 produces transcripts with different size 3'UTRs

In this work, three different cDNA clones with different size 3'UTRs were isolated from the C. canephora cDNA fruit library. These different mature transcripts may have different stability and post transcriptional regulation is possibly involved. Alternate polyadenylation affects a large fraction of higher eukaryote mRNAs, producing mature transcripts with variable 3' end lengths (Beaudoing and Gautheret 2001). Post-transcriptional regulation mediated by the 3' UTR is characteristic of the glutamine synthetase transgene ($Gmgln\beta$). This gene is post-transcriptionally regulated at the level of transcript stability and thus also with respect to its translational ability mediated by its 3' UTR (Ortega et al. 2006).



385

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

CcETR1 has a small ORF in its 5'leader (uORF)

Accumulation of *CcETR1* transcripts was identical at all stages of fruit development in *C. canephora* and *C. pseudozanguebariae*. But the presence of the ORF upstream of the coding region (uORF) could indicate possible regulation at the translation level. Accumulation of this transcript region was not tested in *C. canephora* or in *C. pseudozanguebariae*.

Presence of a uORF can inhibit or repress the transcription of the main ORF. Its inhibitory nature could be due to the synthesis of a polypeptide that locally blocks the transcription re-initiation under certain conditions, as observed in mammalian AdoMetDC (Mize et al. 1998). The importance of uORFs in the regulation of translation depends on length, the encoded peptide, the spacing and/or sequences in the inter-cistronic region, and the physiological status of the cell. One or several of these aspects could thus be involved in transcription regulation of *ETR1* in coffee plants.

CcETR1 has an intron in the uORF

When we compared the 5'UTR in cDNA with genomic sequences, we observed that *CcETR1* uORF was interrupted by an intron. The sequence of these introns is conserved; except for very short indels among the *Coffea* species. Amplification was always possible. The role of the intron is unknown, but it might be involved in enhancing gene expression. In dicotyledons, introns that stimulate expression are well documented in *Arabidopsis* (Jeong et al. 2006), potato (Fu et al. 1995), soybean (Kato et al. 1998) and tobacco (Plesse et al. 2001). This effect has been named Intron-Mediated Enhancement (IME) of gene expression (Mascarenhas et al. 1990) and the magnitude of IME can be more than 100-fold in certain cases as is the case of the maize Shrunken-1



(Sh1) intron 1 that enhances chimeric gene expression in rice and maize protoplasts (Maas et al. 1991).

In conclusion, *CcETR1* is characterized by a highly conserved coding sequence, the presence of a uORF interrupted by an intron, possible alternative splicing or retention of the fifth intron in the coding sequence and different size 3'UTRs. All these features suggest a highly conserved function of the encoded protein but complex regulation that may differ between *Coffea* species and that may take place at four different levels: transcriptional, post transcriptional, translational or post translational.

Confirmation of the allo-ploidy nature of *C. arabica*

Results of analysis of the fifth intron sequence were in agreement with those of *C. arabica* originating from an interspecific cross between two diploid species. One of the two *C. arabica* sequences was similar to the *C. canephora* sequence (99.5% identity), whereas the other sequence (the largest one) was similar to sequences of *C. eugenioides* (99.3%) and *C. moloundou* (98.7%). The high degree of similarity observed between *C. eugenoides* and *C. arabica* sequences is in accordance with Lashermes et al. (1999) who suggested that *C. eugenoides* and *C. canephora* were the most likely parental species of *C. arabica*. But the self-fertility mechanism of *C. arabica* is not yet understood as both alleged progenitors are allogamous.

Coffea species produce ETR1 transcripts of different size

Alternative splicing combines different splice junctions resulting in transcripts with shuffled exons, alternative 5' or 3' splicing sites, retained introns and different transcript termini. Typically, alternative splicing determines the differential inclusion of coding and non-coding sequence in a transcript.



In *C. pseudozanguebariae* in particular, it is possible that this gene is subject to complex regulation; the splicing machinery could produce transcripts of different sizes when some introns are unspliced or some exons are skipped. In addition, similarly to *CcETR1*, *CpETR1* has two consensus polyadenylation sites inside the fifth intron that might be responsible for incomplete splicing at the 3' terminus. The functionality of these transcripts is uncertain, however, evidence was found for functional truncated ETR1 receptors. In *A. thaliana*, a polypeptide generated by an *AtETR1* transcript lacking the last exon, is similar in structure to the other ethylene receptor of the same sub family (ERS1) in which the receiver domain is absent (Hua et al. 1995). Such a polypeptide could be synthesized in *C. canephora* or *C. pseudozanguebariae* if the poly-adenylation sites located in the 5th intron of *ETR1* are functional

Transgenic Arabidopsis plants expressing a truncated version of the tobacco *Nicotiana tabacum* Histidine Kinase 1 (NTHK1) encoding gene that includes only the transmembrane domain plus the kinase domain could regulate genes implicated in abiotic stresses, like *AtNAC2*, *RD21A* and *VSP2* (Zhou et al. 2006). In addition, these authors showed that the kinase domain alone is enough to regulate *AtERF4* expression. Moreover, the Arabidopsis *etr1-6;etr2-3;ein4-4* triple loss-of-function mutant (which shows a constitutive triple response in absence of ethylene), transformed with a truncated version of *AtETR1* lacking the receiver domain, showed normal growth (Qu and Schaller 2004). Finally, transformation of the *Arabidopsis* double mutants (*ers1-2;etr1-6*) or (*ers1-2;etr1-7*) with a kinase-inactivated *AtETR1* resulted in complete restoration of normal growth and ethylene responsiveness (Wang et al. 2003).

In the same way as for *CcETR1* in coffee trees, Bassett et al. (2002) reported that *PpETR1* in peach (*Prunus persica*) undergoes unusual alternative splicing that



potentially results in different mature transcripts. Use of an alternative 3' splice site to remove the last intron in *PpETR1a* resulted in a polypeptide that was missing three amino acids within the receiver-like domain. Retention of the terminal intron occurs in *PpETR1b*, which, if translated, would result in a truncated protein lacking the receiver-like domain.

ETR1 diversity could be related to fructification time, seed weight and caffeine content

Studies conducted on a population resulting from a back cross between two wild species: *C. pseudozanguebariae* (PSE) and *C. dewevrei* (DEW), showed that the presence of a PSE allele (P) in an heterozygous DP plant induced a reduction of 27 days in fructification time, a 24.7% decrease in the caffeine content of its seeds and a 11.5% decrease in seed weight. A fructification time gene (*Ft1*) in *Coffea* was identified by Akaffou et al. (2003). These authors found an effect of the *Ft1* allele on caffeine content and seed weight. In our study we showed that these characters are also associated with *ETR1* diversity.

Reduction in fructification time is highly correlated with a reduction in the duration of endosperm maturation. The relation between the fructification time, the length of endosperm maturation and the caffeine content of the seeds, could indicate that the main alkaloid accumulation occurs during endosperm maturation. The longer endosperm maturation lasts, the more caffeine accumulates. This assumption needs to be confirmed and further work must be done to study *CcETR1* regulation during coffee fruit development and ripening.

Do Arabidopsis plants that over express *CcETR1* behave like a low-concentration ethylene-insensitive mutant?



When grown in the dark, seedlings of most plants exhibit negative gravitropism, i.e. they grow erect, (away from the head of the gravity vector). *Arabidopsis* transformed seedlings over-expressing *CcETR1* display highly reduced gravitropism. In these plants, the gravitropic response was strikingly attenuated, indicated by an increase in randomization of the normal vertical growth pattern. This response is similar to that observed in seedlings growing in continuous red light (Liscum and Hangarter 1993). Normal growth is partially restored by addition of cytokinin and ethylene at low concentrations even in red light conditions. The ethylene-insensitive mutant *ein2* presents a similar less oriented growth pattern (Golan et al. 1996) which is not restored by cytokinin (Woeste et al. 1999).

Red-pulse treatment significantly reduced ethylene production in etiolated pea epicotyls (Steed et al. 2004). Under normal circumstances, basal ethylene synthesis inactivates a small percentage of receptors thereby enabling the transduction cascade. In the transgenic Arabidopsis plants over-expressing *CcETR1* there is an abundance of ethylene receptor molecules, which leads to a stoichiometric disequilibrium resulting in a permanent blockade of the ethylene cascade signal by trapping all the CTR1 molecules available since there are not sufficient ethylene molecules to inactivate all the receptors present. Addition of 10µM ACC in the germinating medium leads to a normal triple response phenotype. Such transformed plants behave like a low-concentration ethylene-insensitive mutant, demonstrating the ethylene receptor function of the protein encode by *CcETR1*.

ACKNOWLEDGEMENTS

- 527 The authors thank FONACIT and INIA, Venezuela, for doctoral scholarship to Mr. J.
- 528 Bustamante



530 References

531532

540

541

542

543

544

545

546

547

548

549

555

556

557

558

559

- Abeles F, Morgan P, Saltveit M (1992) Ethylene in plant biology. Academic Press., San Diego
- Akaffou DS, Ky CL, Barre P, Hamon P, Louarn J, Noirot M (2003) Identification and mapping of a major gene (Ft1) involved in fructification time in the interspecific cross Coffea pseudozanguebariae × C. liberica var. Dewevrei: impact on caffeine content and seed weight. Theoretical and Applied Genetics 106:1486-
 - Barre P, Akaffou S, Louarn J, Charrier A, Hamon S, Noirot M (1998) Inheritance of caffeine and heteroside contents in an interspecific cross between a cultivated coffee species Coffea liberica var dewevrei and a wild species caffeine-free C. pseudozanguebariae. Theoretical and Applied Genetics 96:306-311
 - Barry CS, Giovannoni JJ (2006) Ripening in the tomato Green-ripe mutant is inhibited by ectopic expression of a protein that disrupts ethylene signaling. Proc Natl Acad Sci U S A 103:7923-7928
 - Bassett CL, Artlip TS, Callahan AM (2002) Characterization of the peach homologue of the ethylene receptor, PpETR1, reveals some unusual features regarding transcript processing. Planta 215:679-688
- Beaudoing E, Gautheret D (2001) Identification of Alternate Polyadenylation Sites and Analysis of their Tissue Distribution Using EST Data. Genome Res. 11:1520-1526
- Bleecker AB, Kende H (2000) Ethylene: A Gaseous Signal Molecule in Plants. Annual Review of Cell and Developmental Biology 16:1-18
 - Chang C, Kwok SF, Bleecker AB, Meyerowitz EM (1993) Arabidopsis ethyleneresponse gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. Science 262:539-544
 - Chen QG, Bleecker AB (1995) Analysis of Ethylene Signal-Transduction Kinetics Associated with Seedling-Growth Response and Chitinase Induction in Wild-Type and Mutant Arabidopsis. Plant Physiol. 108:597-607
- Chen Y-F, Randlett MD, Findell JL, Schaller GE (2002) Localization of the Ethylene Receptor ETR1 to the Endoplasmic Reticulum of Arabidopsis. J. Biol. Chem. 277:19861-19866
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. Plant J 16:735-743
- El-Sharkawy I, Jones B, Li ZG, Lelievre JM, Pech JC, Latche A (2003) Isolation and characterization of four ethylene perception elements and their expression during ripening in pears (Pyrus communis L.) with/without cold requirement. J. Exp. Bot. 54:1615-1625
- 570 Fu H, Kim SY, Park WD (1995) High-Level Tuber Expression and Sucrose Inducibility 571 of a Potato Sus4 Sucrose Synthase Gene Require 5[prime] and 3[prime] 572 Flanking Sequences and the Leader Intron. Plant Cell 7:1387-1394
- Gamble RL, Coonfield ML, Schaller GE (1998) Histidine kinase activity of the ETR1 ethylene receptor from Arabidopsis. PNAS 95:7825-7829



- Gamble RL, Qu X, Schaller GE (2002) Mutational Analysis of the Ethylene Receptor
 ETR1. Role of the Histidine Kinase Domain in Dominant Ethylene Insensitivity.
 Plant Physiol. 128:1428-1438
- 578 Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures 579 of soybean root cells. Experimental Cell Research 50:151-158
- Golan A, Tepper M, Soudry E, Horwitz BA, Gepstein S (1996) Cytokinin, Acting
 through Ethylene, Restores Gravitropism to Arabidopsis Seedlings Grown under
 Red Light. Plant Physiol. 112:901-904
- Guo H, Ecker JR (2004) The ethylene signaling pathway: new insights. Current Opinion in Plant Biology 7:40-49
- Hamon S, Anthony F, Le Pierres D (1984) La variabilité génétique des caféiers spontanés de la section Mozambicoffea A. Chev I. Précisions sur deux espèces affines : Coffea pseuzanguebariae Bridson et C. sp. A. Bridson.:. Bull. Mus. Nath. Hist. Nat. 2:207-223
- Hua J, Chang C, Sun Q, Meyerowitz EM (1995) Ethylene insensitivity conferred by Arabidopsis ERS gene. Science 269:1712-1714
- Hua J, Meyerowitz EM (1998) Ethylene Responses Are Negatively Regulated by a Receptor Gene Family in Arabidopsis thaliana. Cell 94:261-271

594

595

596

597

598

599 600

601

602

603

604

605

606

607 608

609

- Huang Y, Li H, Hutchison CE, Laskey J, Kieber JJ (2003) Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in Arabidopsis. Plant J 33:221-233
- Jeong Y-M, Mun J-H, Lee I, Woo JC, Hong CB, Kim S-G (2006) Distinct Roles of the First Introns on the Expression of Arabidopsis Profilin Gene Family Members. Plant Physiol. 140:196-209
- Kato K, RF W, D S (1998) Increase of foreign gene expression in monocot and dicot cells by an intron in the 5' untranslated region of a soybean phosphoenolpyruvate carboxylase gene. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 62:151-153
- Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldmann KA, Ecker JR (1993) CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the raf family of protein kinases. Cell 72:427-441
- Klee HJ (2002) Control of ethylene-mediated processes in tomato at the level of receptors. J. Exp. Bot. 53:2057-2063
- Ky CL et al. (2000) Interspecific genetic linkage map, segregation distortion and genetic conversion in coffee (Coffea sp.). Theoretical and Applied Genetics 101:669-676
- Ky CL, Louarn J, Guyot B, Charrier A, Hamon S, Noirot M (1999) Relations between and inheritance of chlorogenic acid contents in an interspecific cross between Coffea pseudozanguebariae and Coffea liberica var 'dewevrei'. Theoretical and Applied Genetics 98:628-637
- Lashbrook CC, Tieman DM, Klee HJ (1998) Differential regulation of the tomato ETR gene family throughout plant development. Plant J 15:243-252
- Lashermes P et al. (1999) Molecular characterisation and origin of the Coffea arabica L. genome. Molecular and General Genetics 261:259-266
- Leroy T et al. (2005) Construction and characterization of a Coffea canephora BAC library to study the organization of sucrose biosynthesis genes. Theor Appl Genet:1-10



- Liscum E, Hangarter RP (1993) Genetic Evidence That the Red-Absorbing Form of
 Phytochrome B Modulates Gravitropism in Arabidopsis thaliana. Plant Physiol
 103:15-19
- Maas C, Laufs J, Grant S, Korfhage C, Werr W (1991) The combination of a novel stimulatory element in the first exon of the maize Shrunken-1 gene with the following intron 1 enhances reporter gene expression up to 1000-fold. Plant Mol Biol 16:199-207
- Mahesh V et al. (2006) Isolation and genetic mapping of a Coffea canephora phenylalanine ammonia-lyase gene (CcPAL1) and its involvement in the accumulation of caffeoyl quinic acids. Plant Cell Reports:1-7
- Mascarenhas D, Mettler IJ, Pierce DA, Lowe HW (1990) Intron-mediated enhancement of heterologous gene expression in maize. Plant Mol Biol 15:913-920
- Mize GJ, Ruan H, Low JJ, Morris DR (1998) The Inhibitory Upstream Open Reading
 Frame from Mammalian S-Adenosylmethionine Decarboxylase mRNA Has a
 Strict Sequence Specificity in Critical Positions. J. Biol. Chem. 273:32500 32505
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473–497
 - O'Donnell P, Calvert C, Atzorn R, Wasternack C, Leyser H, Bowles DJ (1996) Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. Science 274:1914-1917
 - Ortega JL, Moguel-Esponda S, Potenza C, Conklin CF, Quintana A, Sengupta-Gopalan C (2006) The 3' untranslated region of a soybean cytosolic glutamine synthetase (GS1) affects transcript stability and protein accumulation in transgenic alfalfa. Plant J 45:832-846
- Parkinson JS (1993) Signal transduction schemes of bacteria. Cell 73:857-871

641

642

643

644

645

646

648

649

650

651

652

653

654

655

- Pereira LFP, Galvao RM, Kobayashi AK, CaçãoII SMB, Esteves VLG (2005) Ethylene production and acc oxidase gene expression during fruit ripening of Coffea arabica L. Braz. J. Plant Physiol 17:283-289
- Perin C et al. (2002) Molecular and genetic characterization of a non-climacteric phenotype in melon reveals two loci conferring altered ethylene response in fruit. Plant Physiol. 129:300-309.
- Plesse B, Criqui M-C, Durr Ae, Parmentier Y, Fleck J, Genschik P (2001) Effects of the polyubiquitin gene Ubi.U4 leader intron and first ubiquitin monomer on reporter gene expression in Nicotiana tabacum. Plant Molecular Biology 45:655-667
- Poncet V, Hamon P, Minier J, Carasco C, Hamon S, Noirot M (2004) SSR crossamplification and variation within coffee trees (Coffea spp.). Genome 47:1071-1081
- Qu X, Schaller GE (2004) Requirement of the Histidine Kinase Domain for Signal Transduction by the Ethylene Receptor ETR1. Plant Physiol. 136:2961-2970
- Resnick JS, Wen CK, Shockey JA, Chang C (2006) REVERSION-TO-ETHYLENE SENSITIVITY1, a conserved gene that regulates ethylene receptor function in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A 103:7917-7922
- Rodriguez F, Esch J, Hall A, Binder B, Schaller G, Bleeker A (1999) A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from Arabidopsis. Science 283: 996-998
- Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning. A laboratory manual, 3 edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York



- Sato-Nara K, Yuhashi K-I, Higashi K, Hosoya K, Kubota M, Ezura H (1999) Stage- and Tissue-Specific Expression of Ethylene Receptor Homolog Genes during Fruit Development in Muskmelon. Plant Physiol. 120:321-330
- Schaller GE, Ladd AN, Lanahan MB, Spanbauer JM, Bleecker AB (1995) The Ethylene
 Response Mediator ETR1 from Arabidopsis Forms a Disulfide-linked Dimer. J.
 Biol. Chem. 270:12526-12530
- Shaw CH (1995) Introduction of cloning plasmids into Agrobacterium tumefaciens.
 Methods Mol Biol 49:33-37
- 677 Steed CL, Taylor LK, Harrison MA (2004) Red light regulation of ethylene 678 biosynthesis and gravitropism in etiolated pea stems. Plant Growth Regul 679 43:117-125
- Wang W, Hall AE, O'Malley R, Bleecker AB (2003) Canonical histidine kinase activity of the transmitter domain of the ETR1 ethylene receptor from Arabidopsis is not required for signal transmission. PNAS 100:352-357
- Woeste KE, Vogel JP, Kieber JJ (1999) Factors regulating ethylene biosynthesis in etiolated Arabidopsis thaliana seedlings. Physiologia Plantarum 105:478-484
- Zhou HL et al. (2006) Roles of ethylene receptor NTHK1 domains in plant growth, stress response and protein phosphorylation. FEBS Lett 580:1239-1250



687 688	Figure legends
689	Figure 1. Genomic DNA blot of ETR1 gene from Coffea canephora and C. dewevrei.
690	Each lane contains 10μg genomic DNA digested with Eco RV or Dra I. The blot shown
691	was hybridized and washed under stringent conditions. Molecular size markers are in
692	kilo base pairs.
693	
694	Figure 2: CcETR1 gene structure in Coffea canephora showing: the 5'UTR short
695	ORF interrupted by an intron; black bars represent transmembrane segments.
696	Diamond indicates GAF domains. Rectangle grey indicates histidine kinase domain
697	Oval indicates receiver domains. The conserved phosphorylation sites upon histidine
698	(H) and aspartate (D) are present. Conserved motifs (NG1FG2) within the histidine
699	kinase domain are present. The five introns of the coding region and three 3'UTRs of
700	different sizes. are showed.
701	
702	Figure 3. Organisation of ETR1 gene 5 th intron in 3 Coffea species. DEW: C. dewevrei;
703	CAN: C. canephora; PSE: C. pseudozanguebariae
704	
705	Figure 4. Different types of ETR1 mature transcripts resulting from alternative or mis-
706	splicing forms found in Coffea canephora (CAN) and C. pseudozanguebariae (PSE).
707	
708	Figure 5. Expression analysis of ETR1 by semi quantitative RT-PCR. Total RNA was
709	isolated from fruits at four development stages for C. pseudozanguebariae (PSE) and
710	two for Coffea canephora (CAN). RT-PCR was performed using cDNA from each

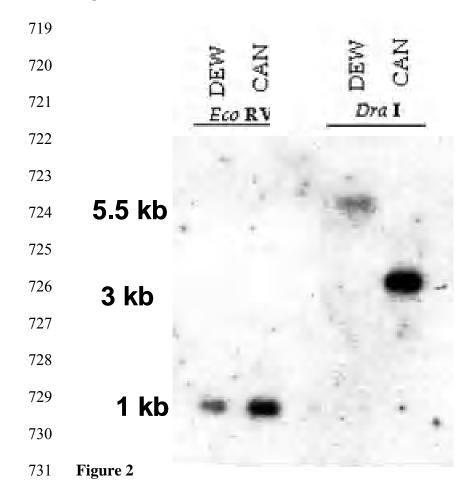


711	stage as template and using gene-specific primers. Reaction was stopped at different
712	cycles to test the amplification. Analysis of $\boldsymbol{\beta}$ actine was included as a control.
713	
714	Figure 6. Effect of over expression of CcETR1 receptor on Arabidopsis wild type dark-
715	grown seedlings. a). Transgenic Arabidopsis without ACC, b) Col 0 without ACC, c)
716	Transgenic in medium with ACC.
717	

718 **Figure 1**

732

737



733 GAF Hydrophobic Histidine Kinase Receiver 3'UTR 5′UTR D 734 Н Ν G1 F G2 Sensor Domain 735 Intron 5'UTR 978 bp Intron 1 1240 bp Intron 5 1148 bp Intron 2 125 bp 162 bp 95 bp 736

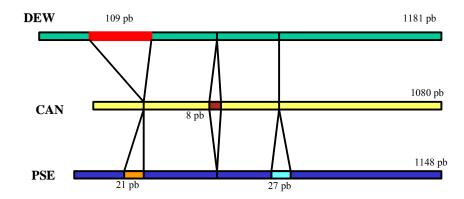


Figure 4

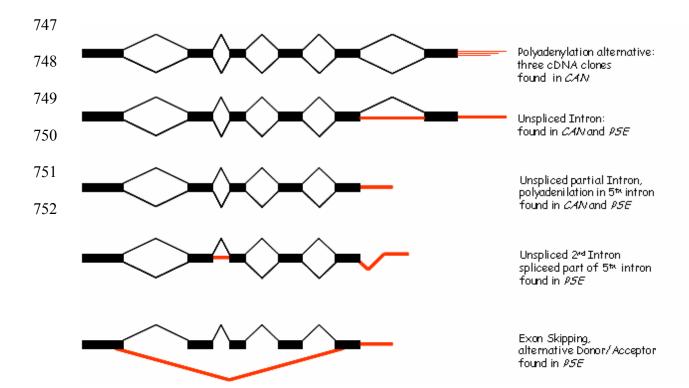




Figure 5

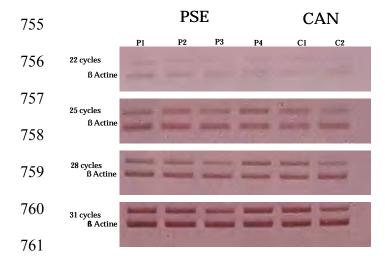


Figure 6

Table 1. ETR1 available sequences of different Coffea species and their accession number in GenBank

Species	cDNA	Genomic	Fifth Intron	5'UTR intron
C. canephora	EF107675	EF107672		EF107683
	EF107676			
	EF107677			
C. pseudozanguebariae	-	EF107674		-
C. dewevrei	-	EF107673		-
C. arabica (var caturra)	-	-	EF107684	EF107678-
			EF107685	
C. moloundou	-	-	EF107687	EF107679
C. eugenioides	-	-	EF107686	-
C. sessiliflora	-	-	-	EF107681
C. heterocalyx	-	-	-	EF107682
C. racemosa	-	-	-	EF107680



Table 2: Effect of ETR1 on several quantitative traits in the interspecific backcross progeny. DD and DP: observed means of homozygotes (DEW/DEW) and heterozygote (DEW/PSE) offspring for ETR1 alleles respectively. % PSE: percentage decrease in the heterozygote compared to the homozygote progeny.

Trait	DD	DP	%PSE	f.d	F	p
Length of fructification	279.8	252.3	9,8 %	1/37	8.881	0.00507
cycle in days (DCF)	± 7.066	± 5.893				
Length of endosperm	125.1	107.1	16,4 %	1/37	13.682	0,00605
maturation in days (DN)	± 4.756	± 3.967				
Caffeine content	0.6532	0.4921	24,7 %	1/48	8.764	0,00476
	± 0.0399	± 0.0369				
Weight of 100 seeds in g	10.247	9.064	11.5%	1/49	5.641	0.021
(P100)	± 0.362	± 0.341				





BIBLIOGRAPHIE

- **Abel, S., Nguyen, M.D., Chow, W., and Theologis, A.** (1995). ACS4, a primary indoleacetic acid-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in Arabidopsis thaliana. Structural characterization, expression in Escherichia coli, and expression characteristics in response to auxin. J Biol Chem **270**, 19093-19099.
- **Abeles, F., Morgan, P., and Saltveit, M.** (1992). Ethylene in plant biology. (San Diego: Academic Press.).
- Achard, P., Vriezen, W.H., Van Der Straeten, D., and Harberd, N.P. (2003). Ethylene regulates arabidopsis development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. Plant Cell 15, 2816-2825.
- Akaffou, D.S., Ky, C.L., Barre, P., Hamon, P., Louarn, J., and Noirot, M. (2003). Identification and mapping of a major gene (Ft1) involved in fructification time in the interspecific cross Coffea pseudozanguebariae × C. liberica var. Dewevrei: impact on caffeine content and seed weight. Theoretical and Applied Genetics 106, 1486-1490.
- Alonso, J.M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S., and Ecker, J.R. (1999). EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. Science **284**, 2148-2152.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Solano, R., Wisman, E., Ferrari, S., Ausubel, F.M., and Ecker, J.R. (2003a). Five components of the ethylene-response pathway identified in a screen for weak ethylene-insensitive mutants in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 2992-2997.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseeuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C., and Ecker, J.R. (2003b). Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana. Science 301, 653-657.
- **Ameha, M., and Belachew, B.** (1985). Heterosis for yield in crosses of indigenous coffee selected for yield and resistance to coffee berry disease. Acta Hortuculturae **158**, 347-352.
- **Anthony, F.** (1992). Les Ressources Génétiques des Caféiers: Collecte, Gestion d'un Conservatoire et évaluation de la Diversité Génétique. In Collection TDM (81) ORSTOM Ed (Paris), pp. 320.
- Anthony, F., Astorga, C., and Berthaud, J. (1999). Los Recursos Genéticos: Bases de una solución genética a los problemas de la caficultora Latinoamericana. In Desafios de la caficultura en Centroamérica, B. Bertrand and B. Rapidel, eds (San José C.R.: IICA.PROMECAFE: CIRAD: IRD/ CCCR.FRANCIA), pp. 369-406.



- **Arteca, J.M., and Arteca, R.N.** (1999). A multi-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1- carboxylate synthase (ACS6) in mature Arabidopsis leaves. Plant Molecular Biology **39,** 209-219.
- **Ascanio, C., E.** (1994). Biologia del café. (Caracas: Universidad Central de Venezuela, CDCH).
- Barre, P., Akaffou, S., Louarn, J., Charrier, A., Hamon, S., and Noirot, M. (1998). Inheritance of caffeine and heteroside contents in an interspecific cross between a cultivated coffee species Coffea liberica var dewevrei and a wild species caffeine-free C. pseudozanguebariae. Theoretical and Applied Genetics 96, 306-311.
- **Barry, C.S., and Giovannoni, J.J.** (2006). Ripening in the tomato Green-ripe mutant is inhibited by ectopic expression of a protein that disrupts ethylene signaling. Proc Natl Acad Sci U S A **103,** 7923-7928.
- **Barry, C.S., Llop-Tous, M.I., and Grierson, D.** (2000). The Regulation of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Synthase Gene Expression during the Transition from System-1 to System-2 Ethylene Synthesis in Tomato. Plant Physiol. **123,** 979-986.
- **Bassett, C.L., Artlip, T.S., and Callahan, A.M.** (2002). Characterization of the peach homologue of the ethylene receptor, PpETR1, reveals some unusual features regarding transcript processing. Planta **215**, 679-688.
- **Bate, N., and Twell, D.** (1998). Functional architecture of a late pollen promoter: pollen-specific transcription is developmentally regulated by multiple stage-specific and co-dependent activator elements. Plant Mol Biol **37,** 859-869.
- Beaudoin, N., Serizet, C., Gosti, F., and Giraudat, J. (2000). Interactions between Abscisic Acid and Ethylene Signaling Cascades. Plant Cell 12, 1103-1116.
- **Beaudoing, E., and Gautheret, D.** (2001). Identification of Alternate Polyadenylation Sites and Analysis of their Tissue Distribution Using EST Data. Genome Res. **11,** 1520-1526.
- **Berthaud, J.** (1986). Les ressources génétiques pour l'amelioration des caféiers africains diploïdes: évaluation de la richese génétique des populations sylvestres et des ses mécanismes organisateurs. Conséquences pour l'aplication. In Travaux et documents de l'ORSTOM, pp. 372.
- **Bertrand, B., Aguilar, M., Santacreo, R., and Anzueto, F.** (1999). El Mejoramiento Genético en América Central. In Desafios de la caficultura en Centroamérica, B. Bertrand and B. Rapidel, eds (San José C.R.: IICA.PROMECAFE: CIRAD: IRD/ CCCR.FRANCIA), pp. 407-456.
- Bertrand, B., Etienne, H., Cilas, C., Charrier, A., and Baradat, P. (2005). Coffea arabica hybrid performance for yield, fertility and bean weight. Euphytica V141, 255-262.
- Bertrand, C., Noirot, M., Doulbeau, S., de Kochko, A., Hamon, S., and Campa, C. (2003). Chlorogenic acid content swap during fruit maturation in Coffea pseudozanguebariae: Qualitative comparison with leaves. Plant Science 165, 1355-1361.
- **Bleecker, A.B., and Kende, H.** (2000). Ethylene: A Gaseous Signal Molecule in Plants. Annual Review of Cell and Developmental Biology **16,** 1-18.
- **Browin, G., and Cannell, M.G.** (1970). Use of 2-Chloroethane phosphonic acid to promote the abscission and ripening fruit of Coffea arabica L. Journal of Horticultural Science **45**, 223-232.



- Bustamante, J., Noirot, M., Campa, C., Hamon, S., and de Kochko, A. (2005). Isolation and characterization of a Coffea canephora ERF-like cDNA. African Journal of Biotechnology 4, 157-159.
- Bustamante, J., Casanova, A., Roso, L., Garnica, J., Alvarado, C., Lacruz, L., Durán, D., Medina, A., Yánez, N., Graterol, J., García, M., Silva, R., and Mesa, J. (2001). Variedad INIA 01. Una variedad de alto rendimiento, tolerante a roya y adaptada a las diferentes áreas cafetaleras de Venezuela. (Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas), pp. 8.
- Bustamante-Porras, J., Noirot, M., Campa, C., Hamon, S., and de Kochko, A. (2005). Isolation and characterization of a Coffea canephora ERF-like c-DNA. African Journal of Biotechnology 4, 157-159.
- **Caillieux, E.** (2004). Caractérisation et expression des gènes codant les N-méthyltransférases (NMT) de la chaîne de biosynthèse de la caféine chez le caféier. DESS Productivité végétale. Raport de stage. Montpellier.
- Cancel, J.D., and Larsen, P.B. (2002). Loss-of-Function Mutations in the Ethylene Receptor ETR1 Cause Enhanced Sensitivity and Exaggerated Response to Ethylene in Arabidopsis. Plant Physiol. 129, 1557-1567.
- **Carvalho, A., and Monaco, L.** (1964). Natural cross-pollination in C. arabica. In International Horticultural Congress (Brussels), pp. 447-449.
- Chae, H.S., and Kieber, J.J. (2005). Eto Brute? Role of ACS turnover in regulating ethylene biosynthesis. Trends Plant Sci 10, 291-296.
- Chae, H.S., Faure, F., and Kieber, J.J. (2003). The eto1, eto2, and eto3 mutations and cytokinin treatment increase ethylene biosynthesis in Arabidopsis by increasing the stability of ACS protein. Plant Cell 15, 545-559.
- Chang, C., Kwok, S.F., Bleecker, A.B., and Meyerowitz, E.M. (1993). Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. Science 262, 539-544.
- Chao, Q., Rothenberg, M., Solano, R., Roman, G., Terzaghi, W., and Ecker+, J.R. (1997). Activation of the Ethylene Gas Response Pathway in Arabidopsis by the Nuclear Protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and Related Proteins. Cell 89, 1133-1144.
- **Chen, Q.G., and Bleecker, A.B.** (1995). Analysis of Ethylene Signal-Transduction Kinetics Associated with Seedling-Growth Response and Chitinase Induction in Wild-Type and Mutant Arabidopsis. Plant Physiol. **108,** 597-607.
- Chen, Y.-F., Randlett, M.D., Findell, J.L., and Schaller, G.E. (2002). Localization of the Ethylene Receptor ETR1 to the Endoplasmic Reticulum of Arabidopsis. J. Biol. Chem. 277, 19861-19866.
- Cheng, H., Qin, L., Lee, S., Fu, X., Richards, D.E., Cao, D., Luo, D., Harberd, N.P., and Peng, J. (2004). Gibberellin regulates Arabidopsis floral development via suppression of DELLA protein function. Development 131, 1055-1064.
- Ciardi, J.A., Tieman, D.M., Lund, S.T., Jones, J.B., Stall, R.E., and Klee, H.J. (2000). Response to Xanthomonas campestris pv. vesicatoria in Tomato Involves Regulation of Ethylene Receptor Gene Expression. Plant Physiol. 123, 81-92.
- Clifford, N.M., and Jarvis, J. (1988). The clorogenic acids content of green robusta coffee beans as possible index of geografic origin. Food Chem. 29, 291-298.



- **Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. Plant J **16**, 735-743.
- Coulibaly, I., Noirot, M., Lorieux, M., Charrier, A., Hamon, S., and Louarn, J. (2002). Introgression of self-compatibility from Coffea heterocalyx to the cultivated species Coffea canephora. Theoretical and Applied Genetics 105, 994-999.
- Coulibaly, I., Revol, B., Noirot, M., Poncet, V., Lorieux, M., Carasco Lacombe, C., Minier, J., Dufour, M., and Hamon, P. (2003). AFLP and SSR polymorphism in a Coffea interspecific backcross progeny [(C. heterocalyx × C. canephora) × C. canephora]. Theoretical and Applied Genetics 107, 1148-1155.
- Cros, J., Combes, M.C., Trouslot, P., Anthony, F., Hamon, S., Charrier, A., and Lashermes, P. (1998). Phylogenetic analysis of chloroplast DNA variation in Coffea L. Mol Phylogenet Evol 9, 109-117.
- **De Castro, R.D., and Marraccini, P.t.** (2006). Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit developmen. Braz. J. Plant Physiol **18**.
- **Deikman, J., Kline, R., and Fischer, R.L.** (1992). Organization of Ripening and Ethylene Regulatory Regions in a Fruit-Specific Promoter from Tomato (Lycopersicon esculentum) Plant Physiol. **100,** 2013-2017.
- Ellis, C., and Turner, J.G. (2001). The Arabidopsis mutant cev1 has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. Plant Cell 13, 1025-1033.
- El-Sharkawy, I., Jones, B., Li, Z.G., Lelievre, J.M., Pech, J.C., and Latche, A. (2003). Isolation and characterization of four ethylene perception elements and their expression during ripening in pears (Pyrus communis L.) with/without cold requirement. J. Exp. Bot. **54**, 1615-1625.
- Ezcurra, I., Ellerstrom, M., Wycliffe, P., Stalberg, K., and Rask, L. (1999). Interaction between composite elements in the napA promoter: both the B-box ABA-responsive complex and the RY/G complex are necessary for seed-specific expression. Plant Mol Biol 40, 699-709.
- Fernandez, D., Santos, P., Agostini, C., Bon, M.-C., Petitot, A.-S., C. Silva, M., Guerra-Guimaraes, L., Ribeiro, A., Argout, X., and Nicole, M. (2004). Coffee (Coffea arabica L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (Hemileia vastatrix). Molecular Plant Pathology 5, 527-536.
- **Fu, X., and Harberd, N.P.** (2003). Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response. Nature **421**, 740-743.
- **Fujimoto, S.Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H., and Ohme-Takagi, M.** (2000). Arabidopsis Ethylene-Responsive Element Binding Factors Act as Transcriptional Activators or Repressors of GCC Box-Mediated Gene Expression. Plant Cell **12,** 393-404.
- **Gamble, R.L., Coonfield, M.L., and Schaller, G.E.** (1998). Histidine kinase activity of the ETR1 ethylene receptor from Arabidopsis. PNAS **95**, 7825-7829.
- **Gamble, R.L., Qu, X., and Schaller, G.E.** (2002). Mutational Analysis of the Ethylene Receptor ETR1. Role of the Histidine Kinase Domain in Dominant Ethylene Insensitivity. Plant Physiol. **128,** 1428-1438.
- **Gamborg, O.L., Miller, R.A., and Ojima, K.** (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research **50,** 151-158.



- **Giovannoni, J.J.** (2004). Genetic Regulation of Fruit Development and Ripening. Plant Cell **16,** S170-180.
- Golan, A., Tepper, M., Soudry, E., Horwitz, B.A., and Gepstein, S. (1996). Cytokinin, Acting through Ethylene, Restores Gravitropism to Arabidopsis Seedlings Grown under Red Light. Plant Physiol. **112**, 901-904.
- **Gomide, M.B., Hostalacio, S., and Duarte, C.** (1978). Efeito de dosagens e numeros de aplicações de Ethrel na formação de mudas de cafeiro (Coffea arabica L.) cultivar Mundo Novo. Ciência e Practica (Escola Superior de Agricultura de Lavras, Minas Gerais) **2,** 214-223.
- **Guo, H., and Ecker, J.R.** (2003). Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF(EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. Cell **115**, 667-677
- **Guo, H., and Ecker, J.R.** (2004). The ethylene signaling pathway: new insights. Current Opinion in Plant Biology **7,** 40-49.
- Hall, A.E., Findell, J.L., Schaller, G.E., Sisler, E.C., and Bleecker, A.B. (2000). Ethylene Perception by the ERS1 Protein in Arabidopsis. Plant Physiol. 123, 1449-1458.
- **Hamilton, D.A., Schwarz, Y.H., and Mascarenhas, J.P.** (1998). A monocot pollen-specific promoter contains separable pollen-specific and quantitative elements. Plant Mol Biol **38**, 663-669.
- **Hamon, S., Anthony, F., and Le Pierres, D.** (1984a). La variabilité génétique des caféiers spontanés de la section Mozambicoffea A. Chev I. Précisions sur deux espèces affines : Coffea pseuzanguebariae Bridson et C. sp. A. Bridson. Bull. Mus. Nath. Hist. Nat. **2,** 207-223.
- **Hamon, S., Anthony, F., and Le Pierres, D.** (1984b). La variabilité génétique des caféiers spontanés de la section Mozambicoffea A. Chev I. Précisions sur deux espèces affines : Coffea pseuzanguebariae Bridson et C. sp. A. Bridson.:. Bull. Mus. Nath. Hist. Nat. **2,** 207-223.
- Harberd, N.P. (2003). Botany. Relieving DELLA restraint. Science 299, 1853-1854.
- **Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., and Korenaga, T.** (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. Nucl. Acids Res. **27,** 297-300.
- **Hua, J., and Meyerowitz, E.M.** (1998). Ethylene Responses Are Negatively Regulated by a Receptor Gene Family in Arabidopsis thaliana. Cell **94,** 261-271.
- Hua, J., Chang, C., Sun, Q., and Meyerowitz, E.M. (1995a). Ethylene insensitivity conferred by Arabidopsis ERS gene. Science 269, 1712-1714.
- Hua, J., Chang, C., Sun, Q., and Meyerowitz, E.M. (1995b). Ethylene insensitivity conferred by Arabidopsis ERS gene. Science 269, 1712-1714.
- Hua, J., Sakai, H., Nourizadeh, S., Chen, Q.G., Bleecker, A.B., Ecker, J.R., and Meyerowitz, E.M. (1998). EIN4 and ERS2 Are Members of the Putative Ethylene Receptor Gene Family in Arabidopsis. Plant Cell 10, 1321-1332.
- Huang, Y., Li, H., Hutchison, C.E., Laskey, J., and Kieber, J.J. (2003). Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in Arabidopsis. Plant J 33, 221-233.
- Jofuku, K.D., den Boer, B.G., Van Montagu, M., and Okamuro, J.K. (1994). Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene APETALA2. Plant Cell 6, 1211-1225.



- **Kagaya, Y., Ohmiya, K., and Hattori, T.** (1999). RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. Nucl. Acids Res. **27,** 470-478.
- **Kende, H.** (1993). Ethylene Biosynthesis. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **44**, 283-307.
- Kieber, J.J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K.A., and Ecker, J.R. (1993). CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the raf family of protein kinases. Cell **72**, 427-441.
- **Klee, H.J.** (2002). Control of ethylene-mediated processes in tomato at the level of receptors. J. Exp. Bot. **53**, 2057-2063.
- **Klee, H.J.** (2004). Ethylene Signal Transduction. Moving beyond Arabidopsis. Plant Physiol. **135**, 660-667.
- **Kneissl, M.L., and Deikman, J.** (1996). The Tomato E8 Gene Influences Ethylene Biosynthesis in Fruit but Not in Flowers. Plant Physiol **112,** 537-547.
- **Knight, L.I., Rose, R.C., and crocker, W.** (1910). Effect of various gases and vapors upon etiolated seedlings of sweet pea. Science **31**, 635-636.
- Knoester, M., van Loon, L.C., van den Heuvel, J., Hennig, J., Bol, J.F., and Linthorst, H.J.M. (1998). Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 1933-1937.
- **Kovaleva, L., and Zakharova, E.** (2003). Hormonal status of the pollen-pistil system at the progamic phase of fertilization after compatible and incompatible pollination in *Petunia hybrida* L. Sexual Plant Reproduction **16,** 191-196.
- **Ky, C.L., Louarn, J., Guyot, B., Charrier, A., Hamon, S., and Noirot, M.** (1999). Relations between and inheritance of chlorogenic acid contents in an interspecific cross between Coffea pseudozanguebariae and Coffea liberica var 'dewevrei'. Theoretical and Applied Genetics **98**, 628-637.
- Ky, C.L., Barre, P., Lorieux, M., Trouslot, P., Akaffou, D.S., Louarn, J., Charrier, A., Hamon, S., and Noirot, M. (2000). Interspecific genetic linkage map, segregation distortion and genetic conversion in coffee (Coffea sp.). Theoretical and Applied Genetics 101, 669-676.
- **Lashbrook, C.C., Tieman, D.M., and Klee, H.J.** (1998). Differential regulation of the tomato ETR gene family throughout plant development. Plant J **15**, 243-252.
- **Lashermes, P., Combes, M.C., Trouslot, P., and Charrier, A.** (1997). Phylogenetic relationships of coffee-tree species (Coffea L.) as inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. TAG Theoretical and Applied Genetics **94,** 947-955.
- Lashermes, P., Couturon, E., Moreau, N., Paillard, M., and Louarn, J. (1996). Inheritance and genetic mapping of self-compatibility in Coffea canephora. Theoretical and Applied Genetics **93**, 458-462.
- Lashermes, P., Combes, M.C., Robert, J., Trouslot, P., D'Hont, A., Anthony, F., and Charrier, A. (1999). Molecular characterisation and origin of the Coffea arabica L. genome. Molecular and General Genetics **261**, 259-266.
- **Le Pierrès, D.** (1995). Etude des hybrides interspécifiques tetraploïdes de premiere génération entre Coffea arabica L. et les caféiers diploïdes. (Université Paris-XI Orsay), pp. 298.
- Lelievre, J.-M., Latche, A., Jones, B., Bouzayen, M., and Pech, J.-C. (1997). Ethylene and fruit ripening. Physiologia Plantarum 101, 727-739.
- **Leon, P., and Sheen, J.** (2003). Sugar and hormone connections. Trends Plant Sci **8**, 110-116.



- Leroy, T., Montagnon, C., Cilas, C., Yapo, A., Charmetant, P., and Eskes, A.B. (1997). Reciprocal recurrent selection applied to Coffea canephora Pierre. III. Genetic gains and results of first cycle intergroup crosses. Euphytica 95, 347-354.
- Leroy, T., Marraccini, P., Dufour, M., Montagnon, C., Lashermes, P., Sabau, X., Ferreira, L.P., Jourdan, I., Pot, D., Andrade, A.C., Glaszmann, J.C., Vieira, L.G., and Piffanelli, P. (2005). Construction and characterization of a Coffea canephora BAC library to study the organization of sucrose biosynthesis genes. Theor Appl Genet, 1-10.
- Li, H., Johnson, P., Stepanova, A., Alonso, J.M., and Ecker, J.R. (2004). Convergence of signaling pathways in the control of differential cell growth in Arabidopsis. Dev Cell 7, 193-204.
- Li, J., Dai, X., and Zhao, Y. (2006). A Role for Auxin Response Factor 19 in Auxin and Ethylene Signaling in Arabidopsis. Plant Physiol. **140**, 899-908.
- **Liang, X., Shen, N.F., and Theologis, A.** (1996). Li+-regulated 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene expression in Arabidopsis thaliana. The Plant Journal **10,** 1027-1036.
- **Liang, X., Abel, S., Keller, J.A., Shen, N.F., and Theologis, A.** (1992). The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of Arabidopsis thaliana. Proc Natl Acad Sci U S A **89,** 11046-11050.
- **Liang, X., Oono, Y., Shen, N.F., Kohler, C., Li, K., Scolnik, P.A., and Theologis, A.** (1995). Characterization of two members (ACS1 and ACS3) of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of Arabidopsis thaliana. Gene **167,** 17-24.
- **Lincoln, J.E., and Fischer, R.L.** (1988). Regulation of Gene Expression by Ethylene in Wild-Type and rin Tomato (Lycopersicon esculentum) Fruit Plant Physiol. **88,** 370-374.
- **Linden, J.C., and Schaller, G.** (2006). Impact of jasmonate esters on ETR1 ethylene binding and the triple response. In 7th International Symposium on the plant hormone Ethylene (Pisa).
- **Liscum, E., and Hangarter, R.P.** (1993). Genetic Evidence That the Red-Absorbing Form of Phytochrome B Modulates Gravitropism in Arabidopsis thaliana. Plant Physiol **103,** 15-19.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sanchez-Serrano, J.J., and Solano, R. (2003). ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 Integrates Signals from Ethylene and Jasmonate Pathways in Plant Defense. Plant Cell 15, 165-178.
- **Louarn, J.** (1992). La fertilité des hybrides interspecifiques et les relations génomiques entre caféiers diploïdes d'orige Africaine (Genre Coffea L. sous genre Coffea). (Univ. Paris.-Sud (Orsay).), pp. 200 p.
- Mahesh, V., Rakotomalala, J., Le Gal, L., Vigne, H., de Kochko, A., Hamon, S., Noirot, M., and Campa, C. (2006). Isolation and genetic mapping of a Coffea canephora phenylalanine ammonia-lyase gene (CcPAL1) and its involvement in the accumulation of caffeoyl quinic acids. Plant Cell Reports, 1-7.
- **McMahon Smith, J., and Arteca, R.N.** (2000). Molecular control of ethylene production by cyanide in Arabidopsis thaliana. Physiologia Plantarum **109**, 180-187
- Mize, G.J., Ruan, H., Low, J.J., and Morris, D.R. (1998). The Inhibitory Upstream Open Reading Frame from Mammalian S-Adenosylmethionine Decarboxylase



- mRNA Has a Strict Sequence Specificity in Critical Positions. J. Biol. Chem. **273**, 32500-32505.
- Montgomery, J., Goldman, S., Deikman, J., Margossian, L., and Fischer, R.L. (1993). Identification of an ethylene-responsive region in the promoter of a fruit ripening gene. Proc Natl Acad Sci U S A **90**, 5939-5943.
- Morgan, P.W., and Gausman, H.W. (1966). Effects of Ethylene on Auxin Transport Plant Physiol. 41, 45-52.
- Moussatche, P., and Klee, H.J. (2004). Autophosphorylation Activity of the Arabidopsis Ethylene Receptor Multigene Family. J. Biol. Chem. **279**, 48734-48741.
- **Murashige, T., and Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant **15,** 473–497.
- Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T., and Shinshi, H. (2006). Genome-Wide Analysis of the ERF Gene Family in Arabidopsis and Rice. Plant Physiol **140**, 411-432.
- Nakatsuka, A., Murachi, S., Okunishi, H., Shiomi, S., Nakano, R., Kubo, Y., and Inaba, A. (1998). Differential Expression and Internal Feedback Regulation of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Synthase, 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Oxidase, and Ethylene Receptor Genes in Tomato Fruit during Development and Ripening. Plant Physiol. 118, 1295-1305.
- O'Donnell, P., Calvert, C., Atzorn, R., Wasternack, C., Leyser, H., and Bowles, D.J. (1996). Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. Science **274**, 1914-1917.
- O'Donnell, P.J., Schmelz, E., Block, A., Miersch, O., Wasternack, C., Jones, J.B., and Klee, H.J. (2003). Multiple Hormones Act Sequentially to Mediate a Susceptible Tomato Pathogen Defense Response. Plant Physiol. 133, 1181-1189.
- Oetiker, J.H., Olson, D.C., Shiu, O.Y., and Yang, S.F. (1997). Differential induction of seven 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes by elicitor in suspension cultures of tomato (Lycopersicon esculentum). Plant Mol Biol 34, 275-286.
- **Ohme-Takagi, M., and Shinshi, H.** (1995). Ethylene-Inducible DNA Binding Proteins That Interact with an Ethylene-Responsive Element. Plant Cell **7,** 173-182.
- **Opile, W.R.** (1978). Influence of fruit stage on the use of (2-chloroethyl) phosphonic acid (CEPA) in Kenya. Kenya Coffee (Nairobi) **43,** 301-309.
- Ortega, J.L., Moguel-Esponda, S., Potenza, C., Conklin, C.F., Quintana, A., and Sengupta-Gopalan, C. (2006). The 3' untranslated region of a soybean cytosolic glutamine synthetase (GS1) affects transcript stability and protein accumulation in transgenic alfalfa. Plant J 45, 832-846.
- Overmyer, K., Tuominen, H., Kettunen, R., Betz, C., Langebartels, C., Sandermann, H., , Jr., and Kangasjarvi, J. (2000). Ozone-Sensitive Arabidopsis rcd1 Mutant Reveals Opposite Roles for Ethylene and Jasmonate Signaling Pathways in Regulating Superoxide-Dependent Cell Death. Plant Cell 12, 1849-1862.
- **Oyebade, I.T.** (1971). Use of pre-harvest sprays of ethrel (2-Chloroethane phosphonic acid) on Robusta coffee (Coffea canephora Pierre). Turrialba **21**, 442-444.
- **Oyebade, I.T.** (1976). Influence of pre-harvest sprays of Ethrel on ripening and abscission of coffee berries. Turrialba **26**, 86-89.



- **Parkinson, J.S.** (1993). Signal transduction schemes of bacteria. Cell **73**, 857-871.
- **Payton, S., Fray, R.G., Brown, S., and Grierson, D.** (1996). Ethylene receptor expression is regulated during fruit ripening, flower senescence and abscission. Plant Mol Biol **31,** 1227-1231.
- Penarrubia, L., Aguilar, M., Margossian, L., and Fischer, R.L. (1992). An Antisense Gene Stimulates Ethylene Hormone Production during Tomato Fruit Ripening. Plant Cell 4, 681-687.
- **Peng, H.P., Lin, T.Y., Wang, N.N., and Shih, M.C.** (2005). Differential expression of genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in Arabidopsis during hypoxia. Plant Mol Biol **58,** 15-25.
- Penninckx, I.A.M.A., Thomma, B.P.H.J., Buchala, A., Metraux, J.-P., and Broekaert, W.F. (1998). Concomitant Activation of Jasmonate and Ethylene Response Pathways Is Required for Induction of a Plant Defensin Gene in Arabidopsis. Plant Cell 10, 2103-2114.
- Pereira, L.F.P., Galvao, R.M., Kobayashi, A.K., CaçãoII, S.M.B., and Esteves, V.L.G. (2005). Ethylene production and acc oxidase gene expression during fruit ripening of Coffea arabica L. Braz. J. Plant Physiol 17, 283-289.
- Perin, C., Gomez, J., Hagen, L., Dogimont, C., Pech, J., Latche, A., Pitrat, M., and Lelievre, J. (2002). Molecular and genetic characterization of a non-climacteric phenotype in melon reveals two loci conferring altered ethylene response in fruit. Plant Physiol. **129**, 300-309.
- **Pirrung, M.C.** (1999). Histidine kinases and two-component signal transduction systems. Chem Biol **6,** R167-175.
- Plesse, B., Criqui, M.-C., Durr, A.e., Parmentier, Y., Fleck, J., and Genschik, P. (2001). Effects of the polyubiquitin gene Ubi.U4 leader intron and first ubiquitin monomer on reporter gene expression in Nicotiana tabacum. Plant Molecular Biology 45, 655-667.
- Poncet, V., Hamon, P., Minier, J., Carasco, C., Hamon, S., and Noirot, M. (2004). SSR cross-amplification and variation within coffee trees (Coffea spp.). Genome 47, 1071-1081.
- Potuschak, T., Lechner, E., Parmentier, Y., Yanagisawa, S., Grava, S., Koncz, C., and Genschik, P. (2003). EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two arabidopsis F box proteins: EBF1 and EBF2. Cell 115, 679-689.
- **Qu, X., and Schaller, G.E.** (2004). Requirement of the Histidine Kinase Domain for Signal Transduction by the Ethylene Receptor ETR1. Plant Physiol. **136,** 2961-2970.
- **Rahman, A., Amakawa, T., Goto, N., and Tsurumi, S.** (2001). Auxin is a positive regulator for ethylene-mediated response in the growth of Arabidopsis roots. Plant Cell Physiol **42,** 301-307.
- Rahman, A., Hosokawa, S., Oono, Y., Amakawa, T., Goto, N., and Tsurumi, S. (2002). Auxin and ethylene response interactions during Arabidopsis root hair development dissected by auxin influx modulators. Plant Physiol 130, 1908-1917.
- Rakotomalala, J. (1993). Diversité Biochimique des caféiers. In TDM, ORSTOM, pp. 216
- **Raz, V., and Ecker, J.** (1999). Regulation of differential growth in the apical hook of Arabidopsis. Development **126,** 3661-3668.



- Resnick, J.S., Wen, C.K., Shockey, J.A., and Chang, C. (2006). REVERSION-TO-ETHYLENE SENSITIVITY1, a conserved gene that regulates ethylene receptor function in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 7917-7922.
- Richards, D.E., King, K.E., Ait-ali, T., and Harberd, N.P. (2001). HOW GIBBERELLIN REGULATES PLANT GROWTH AND DEVELOPMENT: A Molecular Genetic Analysis of Gibberellin Signaling. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **52**, 67-88.
- **Riechmann, J.L., and Meyerowitz, E.M.** (1998). The AP2/EREBP family of plant transcription factors. Biol Chem **379**, 633-646.
- Rodriguez, F., Esch, J., Hall, A., Binder, B., Schaller, G., and Bleeker, A. (1999). A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from Arabidopsis. Science 283, 996-998.
- Roman, G., Lubarsky, B., Kieber, J.J., Rothenberg, M., and Ecker, J.R. (1995). Genetic Analysis of Ethylene Signal Transduction in Arabidopsis thaliana: Five Novel Mutant Loci Integrated into a Stress Response Pathway. Genetics 139, 1393-1409.
- Rottmann, W.H., Peter, G.F., Oeller, P.W., Keller, J.A., Shen, N.F., Nagy, B.P., Taylor, L.P., Campbell, A.D., and Theologis, A. (1991). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato is encoded by a multigene family whose transcription is induced during fruit and floral senescence, Journal of Molecular Biology 222, 937-961.
- Ruonala, R., Rinne, P.L., Moritz, T., Tuominen, H., and Kangasjarvi, J. (2006a). Ethylene affects meristem behaviour in birch. In 7th International Symposium on the plant hormone Ethylene (Pisa).
- Ruonala, R., Rinne, P.L., Baghour, M., Moritz, T., Tuominen, H., and Kangasjarvi, J. (2006b). Transitions in the functioning of the shoot apical meristem in birch (Betula pendula) involve ethylene. Plant J 46, 628-640.
- Sakai, H., Hua, J., Chen, Q.G., Chang, C., Medrano, L.J., Bleecker, A.B., and Meyerowitz, E.M. (1998). ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signaling in Arabidopsis. PNAS 95, 5812-5817.
- Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J.G., Abe, H., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002). DNA-Binding Specificity of the ERF/AP2 Domain of Arabidopsis DREBs, Transcription Factors Involved in Dehydration- and Cold-Inducible Gene Expression. Biochemical and Biophysical Research Communications 290, 998-1009.
- Samach, A., Onouchi, H., Gold, S.E., Ditta, G.S., Schwarz-Sommer, Z., Yanofsky, M.F., and Coupland, G. (2000). Distinct Roles of CONSTANS Target Genes in Reproductive Development of Arabidopsis. Science 288, 1613-1616.
- **Sambrook, J., and Russell, D.W.** (2001). Molecular cloning. A laboratory manual. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sato-Nara, K., Yuhashi, K.-I., Higashi, K., Hosoya, K., Kubota, M., and Ezura, H. (1999). Stage- and Tissue-Specific Expression of Ethylene Receptor Homolog Genes during Fruit Development in Muskmelon. Plant Physiol. **120**, 321-330.
- Schaller, G.E., Ladd, A.N., Lanahan, M.B., Spanbauer, J.M., and Bleecker, A.B. (1995). The Ethylene Response Mediator ETR1 from Arabidopsis Forms a Disulfide-linked Dimer. J. Biol. Chem. **270**, 12526-12530.
- **Shaw, C.H.** (1995). Introduction of cloning plasmids into Agrobacterium tumefaciens. Methods Mol Biol **49,** 33-37.



- **Sheen, J., Zhou, L., and Jang, J.C.** (1999). Sugars as signaling molecules. Curr Opin Plant Biol **2,** 410-418.
- Shi, Y.H., Zhu, S.W., Mao, X.Z., Feng, J.X., Qin, Y.M., Zhang, L., Cheng, J., Wei, L.P., Wang, Z.Y., and Zhu, Y.X. (2006). Transcriptome profiling, molecular biological, and physiological studies reveal a major role for ethylene in cotton fiber cell elongation. Plant Cell 18, 651-664.
- **Shirsat, A., Wilford, N., Croy, R., and Boulter, D.** (1989). Sequences responsible for the tissue specific promoter activity of a pea legumin gene in tobacco. Mol Gen Genet **215**, 326-331.
- **Shiu, O.Y., Oetiker, J.H., Yip, W.K., and Yang, S.F.** (1998). The promoter of LE-ACS7, an early flooding-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of the tomato, is tagged by a Sol3 transposon. PNAS **95**, 10334-10339.
- **Snoeck, J.** (1973). Adaptation d'une méthode de groupement de la maturation des fruits de caféier Robusta. Essai préliminaire avec l'éthéphon. Café Cacao Thé **XVII**, 129-136.
- **Snoeck, J.** (1977). Essais de groupement de la récolte des fruits du caféier Canephora à l'aide de l'étéphon. Café Cacao Thé **XXI**, 163-178.
- **Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q., and Ecker, J.R.** (1998). Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. Genes Dev. **12,** 3703-3714.
- **Sondahl, M.R., and Petracco, M.** (1997). Improvement of coffee cup quality by Ethylene. In ASIC, 17th Colloque (Nairobi).
- **Steed, C.L., Taylor, L.K., and Harrison, M.A.** (2004). Red light regulation of ethylene biosynthesis and gravitropism in etiolated pea stems. Plant Growth Regul **43**, 117-125.
- **Stepanova, A.N., and Alonso, J.M.** (2005). Ethylene signalling and response pathway: a unique signalling cascade with a multitude of inputs and outputs. Physiologia Plantarum **123,** 195-206.
- **Stepanova, A.N., Hoyt, J.M., Hamilton, A.A., and Alonso, J.M.** (2005). A Link between ethylene and auxin uncovered by the characterization of two root-specific ethylene-insensitive mutants in Arabidopsis. Plant Cell **17**, 2230-2242.
- Sudhakara, R., Venkataramanan, D., Partha, T.S., and Rao, K.N. (1978). Ethylene induced changes in the chemical composition of coffee mucilage. Turrialba 28, 153-155.
- **Takada, K., Ishimaru, K., Kamada, H., and Ezura, H.** (2006). Anther-specific expression of mutated melon ethylene receptor gene Cm-ERS1/H70A affected tapetum degeneration and pollen grain production in transgenic tobacco plants. Plant Cell Rep **25**, 936-941.
- **Tatsuki, M., and Mori, H.** (2001). Phosphorylation of Tomato 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid Synthase, LE-ACS2, at the C-terminal Region. J. Biol. Chem. **276,** 28051-28057.
- **Tieman, D.M., and Klee, H.J.** (1999). Differential Expression of Two Novel Members of the Tomato Ethylene-Receptor Family. Plant Physiol. **120,** 165-172.
- **Tieman, D.M., Taylor, M.G., Ciardi, J.A., and Klee, H.J.** (2000). The tomato ethylene receptors NR and LeETR4 are negative regulators of ethylene response and exhibit functional compensation within a multigene family. PNAS **97,** 5663-5668.



- **Tournier, B., Sanchez-Ballesta, M.T., Jones, B., Pesquet, E., Regad, F., Latche, A., Pech, J.C., and Bouzayen, M.** (2003). New members of the tomato ERF family show specific expression pattern and diverse DNA-binding capacity to the GCC box element. FEBS Lett **550,** 149-154.
- **Upegui, G., and Valencia, G.** (1972). Anticipación de la maduración de la cosecha de café con aplicaciones de Ethrel. Cenicafé **XXIII,** 19-26.
- **Vahala, J., Schlagnhaufer, C.D., and Pell, E.J.** (1998). Induction of an ACC synthase cDNA by ozone in light grown Arabidopsis thaliana leaves. Physiologia Plantarum **103**, 45-50.
- Van Der Straeten, D., Rodrigues-Pousada, R., Villarroel, R., Hanley, S., Goodman, H., and Montagu, M. (1992). Cloning, Genetic Mapping, and Expression Analysis of an Arabidopsis thaliana Gene that Encodes 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Synthase. PNAS 89, 9969-9973.
- **Vogel, J.P., Woeste, K.E., Theologis, A., and Kieber, J.J.** (1998). Recessive and dominant mutations in the ethylene biosynthetic gene ACS5 of Arabidopsis confer cytokinin insensitivity and ethylene overproduction, respectively. PNAS **95,** 4766-4771.
- Vrebalov, J., Ruezinsky, D., Padmanabhan, V., White, R., Medrano, D., Drake, R., Schuch, W., and Giovannoni, J. (2002). A MADS-Box Gene Necessary for Fruit Ripening at the Tomato Ripening-Inhibitor (Rin) Locus. Science 296, 343-346
- Vriezen, W.H., Achard, P., Harberd, N.P., and Van Der Straeten, D. (2004). Ethylene-mediated enhancement of apical hook formation in etiolated Arabidopsis thaliana seedlings is gibberellin dependent. The Plant Journal 37, 505-516.
- Wang, W., Hall, A.E., O'Malley, R., and Bleecker, A.B. (2003). Canonical histidine kinase activity of the transmitter domain of the ETR1 ethylene receptor from Arabidopsis is not required for signal transmission. PNAS 100, 352-357.
- Wilkinson, J.Q., Lanahan, M.B., Yen, H.C., Giovannoni, J.J., and Klee, H.J. (1995). An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by never-ripe. Science **270**, 1807-1809.
- Wilkinson, J.Q., Lanahan, M.B., Clark, D.G., Bleecker, A.B., Chang, C., Meyerowitz, E.M., and Klee, H.J. (1997). A dominant mutant receptor from Arabidopsis confers ethylene insensitivity in heterologous plants. Nat Biotechnol 15, 444-447.
- Winston, E., Hoult, M., Howitt, C., and Shepherd, R. (1992). Ethylene-induced fruit ripening in arabica coffee (Coffea arabica L.). Australian Journal of Experimental Agriculture 32, 401-408.
- Woeste, K.E., Vogel, J.P., and Kieber, J.J. (1999). Factors regulating ethylene biosynthesis in etiolated Arabidopsis thaliana seedlings. Physiologia Plantarum 105, 478-484.
- **Wurgler-Murphy, S.M., and Saito, H.** (1997). Two-component signal transducers and MAPK cascades. Trends Biochem Sci **22,** 172-176.
- **Yanagisawa, S., Yoo, S.D., and Sheen, J.** (2003). Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants. Nature **425,** 521-525.
- Yang, S. (1987). The role of ethylene and ethylene synthesis in fruit ripening. In Plant Senescence: Its Biochemistry and Physiology, T. W, E. Nothnagel, and R.



- Huffaker, eds (Rockville, MD: The American Society of Plant Physiologists), pp. 156–165.
- **Zarembinski, T.I., and Theologis, A.** (1994). Ethylene biosynthesis and action: a case of conservation. Plant Mol Biol **26,** 1579-1597.
- **Zhao, X.C., and Schaller, G.E.** (2004). Effect of salt and osmotic stress upon expression of the ethylene receptor ETR1 in Arabidopsis thaliana. FEBS Lett **562,** 189-192.
- **Zhao, X.C., Qu, X., Mathews, D.E., and Schaller, G.E.** (2002). Effect of ethylene pathway mutations upon expression of the ethylene receptor ETR1 from Arabidopsis. Plant Physiol **130**, 1983-1991.
- **Zhong, G.V., and Burns, J.K.** (2003). Profiling ethylene-regulated gene expression in Arabidopsis thaliana by microarray analysis. Plant Mol Biol **53,** 117-131.
- **Zhou, D., Kalaitzis, P., Mattoo, A.K., and Tucker, M.L.** (1996). The mRNA for an ETR1 homologue in tomato is constitutively expressed in vegetative and reproductive tissues. Plant Molecular Biology **30**, 1331-1338.
- Zhou, H.L., Cao, W.H., Cao, Y.R., Liu, J., Hao, Y.J., Zhang, J.S., and Chen, S.Y. (2006). Roles of ethylene receptor NTHK1 domains in plant growth, stress response and protein phosphorylation. FEBS Lett **580**, 1239-1250.
- **Zhou, L., Jang, J.C., Jones, T.L., and Sheen, J.** (1998). Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an Arabidopsis glucose-insensitive mutant. Proc Natl Acad Sci U S A **95,** 10294-10299.
- **Zhu, C., Gan, L., Shen, Z., and Xia, K.** (2006). Interactions between jasmonates and ethylene in the regulation of root hair development in Arabidopsis. J Exp Bot **57**, 1299-1308.

