

2022-2023

Mention Biologie Végétale

Débourrement de bourgeons et microARNs

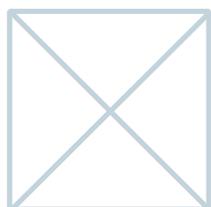
Implication des microARNs dans
la régulation de la croissance des
bourgeons et de son photo-
contrôle chez le rosier buisson
Rosa 'Radrazz'

Gilmé Méline |

Sous la direction de Mme |
Gentilhomme José

Membres du jury
Simier Philippe | Président
Limami Anis | Auditeur
Veronesi Christophe | Tuteur

Soutenu
confidentiellement
le 7 juillet 2023



§ PARTIE RESERVEE A L'ETUDIANT(E)

Courriel: melgilme@etud.univ-angers.fr

N   tudiant :19003267.....

Je soussigné(e) **GILME Méline**.....

certifie être l'auteur du document intitulé : **D bournement de bourgeons et microARNs- Implication des microARNs dans la régulation de la croissance des bourgeons et de son photo-contrôle chez le rosier buisson Rosa 'Radrazz'**

préparé sous la direction de **GENTILHOMME José**.....

et soutenu le 7 juillet 2023.....

Je certifie la conformité de la version électronique déposée avec l'exemplaire imprimé remis au jury et certifie disposer de tous les droits sur les documents figurant dans mon mémoire ou, à défaut, disposer de toutes les autorisations nécessaires auprès des ayants droits. Agissant en l'absence de toute contrainte et sachant que je dispose à tout moment d'un droit de retrait de mes travaux :

- J'autorise la diffusion du document en texte intégral par l'Université d'Angers :
- en accès : tout public à compter : de la date de soutenance
 réservé UA Décembre 2025
- Je n'autorise pas la diffusion du document.

Le : 27 juin 2023

  : ANGERS

Signature :

MG

§ PARTIE RESERVEE AU (A LA) MAITRE DE STAGE

- J'autorise la diffusion du document en texte intégral par l'Université d'Angers :
- en accès : tout public à compter : de la date de soutenance
 réservé UA du Décembre 2025.....
- Je n'autorise pas la diffusion du document.

Nom du (de la) maître de stage : José GENTILHOMME



Le : 27 Juin 2023   : Angers

Signature :

- J'autorise la diffusion du document en texte intégral par l'Université d'Angers :
- sans corrections en accès : tout public à compter : de la date de soutenance
 avec corrections réservé UA du
- Je n'autorise pas la diffusion du document.



L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

Consulter la licence creative commons complète en français :

<http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/>

Ces conditions d'utilisation (attribution, pas d'utilisation commerciale, pas de modification) sont symbolisées par les icônes positionnées en pied de page.



REMERCIEMENTS

Avant tout développement sur cette expérience professionnelle, il me paraît opportun de commencer ce rapport de mémoire par des remerciements, à ceux qui m'ont beaucoup appris, et même ceux qui ont eu la gentillesse de faire de ce stage un moment très formateur.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont collaboré au succès de mon stage au sein de l'IRHS et qui m'ont aidée lors de la rédaction de ce mémoire.

Je tiens exprimer toute ma reconnaissance à ma directrice de mémoire, Madame José GENTILHOMME, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses admirables conseils, m'ayant permis à alimenter ma réflexion.

Je remercie l'ensemble des collègues de laboratoire, notamment Maria Dolores PEREZ-GARCIA, pour les conseils qu'ils ont pu me prodiguer au cours de ces deux mois.

Je souhaite remercier tous les professeurs de l'Université d'Angers, qui m'ont fourni tous les outils et toutes les connaissances nécessaires à la réussite de mes études universitaires, et au bon déroulement de ce stage.

Je souhaite remercier Julie Mallet qui, malgré son départ de l'IRHS, a répondu présente lors de visio-conférence afin de m'aider aux divers tests statistiques. Merci pour tout le travail que tu as pu accomplir, qui m'a permis d'être là aujourd'hui.

Un grand merci également à Daniel SOCHARD et Kaat HELLYN ainsi que les membres de l'équipe PHENOTIC dans la préparation et le suivi des plantes *d'Arabidopsis thaliana* en serre.

Je remercie également mes deux camarades de bureau : Alix GRAVELEAU et Marjorie BATAILLE, avec qui nous nous sommes soutenus jusqu'à la fin de ce stage malgré les difficultés rencontrées.

Je tiens à remercier Chloé DAVRANCHE, pour son aide en laboratoire. Tu as réussi à me rassérer lorsque je commençais à paniquer pour un rien. Merci du fond du cœur pour ton soutien, et pour ta foi en moi.

Merci à ma famille, qui pensait que mon mémoire serait aussi long qu'une thèse. Merci de m'avoir aidé à relativiser et décompresser une fois le rendu de mémoire et la soutenance en approche.

Et enfin, un grand merci à Corentin CHEMINEAU, bien que tu ne comprennes rien à ce qui est écrit dans ce mémoire scientifique, merci de l'avoir lu avec considération pour me rassurer. Merci d'avoir été présent dans les moments difficiles, et surtout lorsque la remise de mémoire approchait.

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) **GILME Méline**
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées
pour écrire ce rapport ou mémoire.

le **29 / 04 / 2023**

Abréviations

- ABA : Acide Abscissique
- ADN : Acide DésoxyriboNucléique (=DNA)
- ADNc : ADN complémentaire (=cDNA)
- AGO : Argonaute
- ARN : Acide RiboNucléique (=RNA)
- ARNm : ARN messagers
- BLAST : Basic Local Alignment Search Tool (Outil de Recherche d'Alignements locaux)
- BRC1 : BRANCHED-1
- CK : CytoKinines
- Cq : quantification cycle (=Ct, threshold cycle)
- DCL1 : DICER-LIKE 1
- FT : Facteur de Transcription
- GA : Gibbérellines
- GAPDH : GlycérAldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase
- IAA : Auxine
- INRAE : Institut National de Recherche en Agriculture et Environnement
- miARN :micro ARN (=miR)
- mL : millilitre
- MSTs :Monosaccharide transporters
- pb : paire de bases
- pre-miARN : précurseur de microARN
- pri-ARN :primaire de microARN
- RISC : RNA-induced silencing complex
- RT : Rétrotranscription
- RT-qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction in Real Time
- SL : StrigoLactones
- TCP : TEOSINTE BRANCHED1/CYCLOIDEA/PCF
- UTR : Région non traduite (UnTranslated Region)
- μ L : microlitre

Table des matières

IMPLICATION DES MICROARNS DANS LA REGULATION DE LA CROISSANCE DES BOURGEONS ET DE SON PHOTO-CONTROLE CHEZ LE ROSIER BUISSON ROSA 'RADRAZZ' 1

1.	INTRODUCTION	1
1.1.	<i>Structure d'accueil.....</i>	1
1.2.	<i>Modèle d'étude : Rosa « Radrazz ».....</i>	1
1.3.	<i>Le débourrement des bourgeons axillaires de rosier</i>	2
1.4.	<i>Implication de facteurs endogènes et environnementaux dans le contrôle du débourrement</i>	3
1.4.1.	Les facteurs hormonaux.....	3
1.4.2.	Rôle de BRC1.....	3
1.4.3.	Rôle de la lumière	4
1.5.	<i>Régulation post-transcriptionnelle par les microARNs</i>	5
1.5.1.	Les miARNs	5
1.5.2.	Voie de Biosynthèse	5
1.5.3.	Les miARNs identifiés comme potentiellement exprimés différemment dans le processus de photocontrôle	5
1.6.	<i>Missions confiées et démarches adoptées pour atteindre l'objectif du stage</i>	6
2.	MATERIEL VEGETAL ET CULTURE DES PLANTES	7
2.1.	<i>Culture d'Arabidopsis thaliana.....</i>	7
2.2.	<i>Analyses phénotypiques.....</i>	7
2.3.	<i>Conception des amorces pour la RT-qPCR</i>	8
2.3.1.	Conception des amorces des primaires et des précurseurs miARNs pour l'amplification par qPCR	8
2.3.2.	Transcription reverse des miARNs	8
2.3.3.	Vérification de la pureté par RT-PCR	9
2.3.4.	Mesure des transcrits par RT-qPCR	9
2.4.	<i>Analyses statistiques</i>	19
3.	RESULTATS	11
3.1.	<i>Vérification qualitative et quantitative des ARNs totaux extraits</i>	21
3.1.1.	Nanodrop	21
3.2.	<i>Vérification qualitative des ADNc issus de la RT</i>	21
3.2.1.	Migration sur gel d'agarose	21
3.2.2.	Test efficacité	21
3.2.3.	Test qPCR	12
3.3.	<i>Profil d'expression des pré-miR319s</i>	23
3.4.	<i>Phénotypage des lignées transgéniques d'Arabidopsis thaliana</i>	13
4.	DISCUSSION	16
4.1.	<i>Etude du profil d'expression des pré-miR319s</i>	16
4.2.	<i>Etude du phénotype des lignées transgéniques Arabidopsis</i>	17

4.3. Difficultés rencontrées	18
4.3.1. Designer les amorces	18
4.3.2. Résultats de qPCR non significatifs	19
4.3.3. Culture des plantes transgéniques <i>d'Arabidopsis thaliana</i>	19
5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	20
5.1. Conclusions	20
5.2. Perspectives	41
6. BIBLIOGRAPHIE	22
ANNEXES.....	25

Table des figures

Figure 1 : Organigramme des différentes équipes de l'IRHS et de leurs missions	1
Figure 2 : Etapes du débourrement d'un bourgeon lors de la dominance apicale	2
Figure 3 : Influence de l'auxine sur le débourrement de bourgeons	3
Figure 4 : Modèle d'action de l'auxine sur le débourrement	3
Figure 5 : De nombreux facteurs influencent l'expression de BRC1, notamment des facteurs développementaux, génétiques, hormonaux, des signaux de sucre et des facteurs environnementaux	4
Figure 6 : Représentation schématique du réseau impliqué dans la régulation de la croissance des bourgeons par PHYB	4
Figure 7 : Biogenèse et modes d'action des miARNs chez les plantes.....	5
Figure 8 : Schéma représentant la dénomination des différents organes et axes pour l'analyse phénotypique..	7
Figure 9 : Méthodes de détection et de quantification des miARN par RT-qPCR.....	9
Figure 10 : Profils d'électrophorèse de différents échantillons d'ADNc provenant des ARNs extraits par Julie Mallet de Rosa « Radrazz »	11
Figure 11 : Efficacité des amorces du précurseur de miR319a1.1	11
Figure 12 : Efficacité des amorces du précurseur de miR319a1.2	11
Figure 13 : Melting curves obtenues sur échantillons d'ADNc issus d'ARNs totaux (RT), avec différents couples d'amorces	12
Figure 14 : Variation de l'expression du pré-miARN319a1.1. a) et du pré-miARN319a1.2 (b) au cours du processus de débourrement (de 0 à 96 h après décapitation)	13
Figure 15 : Phénotype de lignées transgéniques d' <i>Arabidopsis thaliana</i> au stade végétatif et au stade reproducteur	13
Figure 16 : Date de montaison (émergence de l'axe principal à 0.5cm) en jours après semis.....	14
Figure 17 : Cinétique des différentes lignées transgéniques surexprimant les <i>RhmiARN319</i> de Rosa 'Radrazz' et d' <i>Arabidopsis (jaw-D)</i> et d'un mutant gène cible résistant au mir319 chez <i>Arabidopsis (soj8)</i>	14
Figure 18 : Phénotype des différentes lignées transgéniques surexprimant les <i>RhmiARN319</i> de Rosa 'Radrazz' et d' <i>Arabidopsis (jaw-D)</i> et d'un mutant gène cible résistant au mir319 chez <i>Arabidopsis (soj8)</i>	15

Table des tableaux et Annexes

Tableau I : Récapitulatif des primaires et précurseurs des miARNs étudiés.....	22
Annexe I: Séquences de l'ensemble des amorces qPCR et de RT utilisés	26
Annexe II : Schéma de sélection du test statistique approprié.....	26
Annexe III : Tableau des différents dosages d'ARN au Nanodrop et volume d'ARN pour la RT.....	27

Scientific organisation

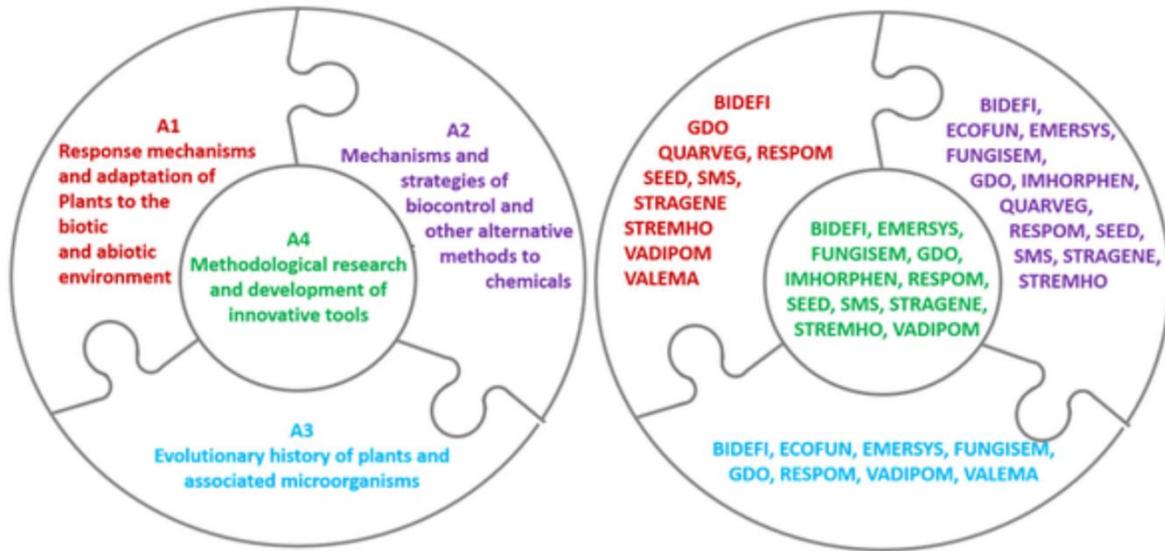


Figure 1 : Organigramme des différentes équipes de l'IRHS et de leurs missions (mise à jour le 10 Mars 2023)

Implication des microARNs dans la régulation de la croissance des bourgeons et de son photo-contrôle chez le rosier buisson *Rosa 'Radrazz'*

1. Introduction

1.1. Structure d'accueil

L'Institut de Recherche en Horticulture et Semences (IRHS) est une unité de recherche INRAE c'est-à-dire de l'institut Nationale de recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement. Elle se situe sur Beaucauzé (49070) et regroupe 260 personnes de L'institut Agro Ouest Rennes Angers et de l'Université d'Angers. L'ensemble des chercheurs et enseignants-chercheurs ont pour mission d'œuvrer au service de la qualité et de la santé des espèces végétales et de la production des semences. Cet Institut se consacre donc au développement de systèmes de production sains et durables pour les différentes filières horticoles et ornementales.

L'institut est organisé en 14 équipes de recherche, dont l'équipe STRAGENE¹ (Figure 1). Cette dernière mène à bien ses recherches pour comprendre les effets de l'environnement abiotique de la plante, en utilisant le rosier buisson comme plante modèle. Cet environnement serait en interaction avec son génotype, son développement architectural aérien et sa ramification.

La variabilité génotypique est donc prise en compte, pour pouvoir trouver des solutions capables de maintenir une performance agronomique satisfaisante dans un contexte environnemental des plus fluctuants (changement climatique, environnement urbain).

1.2. Modèle d'étude : Rosa « Radrazz »

Le rosier, est une plante qui a su être utilisée durant plus de 5000 ans, avant notre ère. La rose a inspiré les poètes, les peintres, les écrivains, les sculpteurs allant même jusqu'à créer une nouvelle gamme d'artistes : les semeurs et les hybrideurs du XXème siècle. Le rosier était et est encore aujourd'hui la plante ornementale la plus importante sur le plan économique. De plus, il est utilisé pour ces propriétés médicinales, par exemple en phytothérapie lorsqu'un patient souffre d'eczéma ou bien de démangeaisons. Le rosier est notamment connu pour ces propriétés de bien-être, étant donné qu'il est utilisé en parfumerie, cosmétique et dans les mélanges d'huiles essentielles (Leghari et al., 2016). Cette plante pérenne et ligneuse appartenant au genre *Rosa*, regroupe plus de 150 espèces (Nakamura et al., 2018).

Le modèle d'étude de l'équipe STRAGENE est le rosier *Rosa* « Radrazz ».

¹ **S**Tstructure et **R**Amification en réponse à l'Interaction **G**énotype-**e**Nvironnement

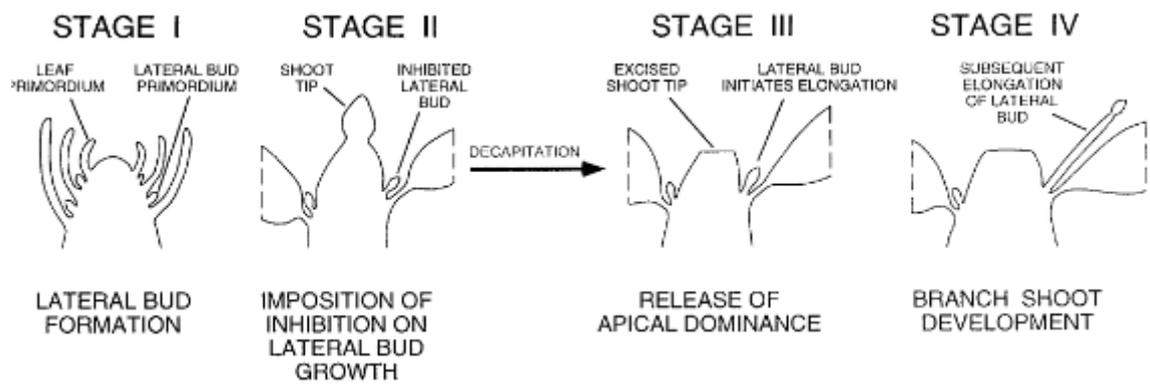


Figure 2 : Etapes du débourrement d'un bourgeon lors de la dominance apicale d'après Cline (1997).

Celui-ci est commercialisé par l'entreprise Meilland Richardier, et est groupé en bouquets de 5 à 15 fleurs. Rosa « Radrazz » est caractérisé par une végétation dense et régulière, et possède une taille annuelle très courte dès le début du printemps, le rendant résistant, sans traitement phytosanitaire.

Ses qualités lui valent de nombreuses récompenses telles que le premier prix de SNHF², et une entrée en 2008 au Panthéon des roses : le WFRS Rose Hall of Fame. De ce fait, ce rosier est le premier cultivar utilisé aux USA pour le fleurissement de massifs. Ainsi, les rosiers ont comme vocation principale leur qualité esthétique, et doivent pouvoir s'adapter dans tous les environnements où on les rencontre, que ce soit en zones urbaines ou bien rurales. Ils doivent s'inscrire dans un environnement changeant de jour en jour, et c'est pourquoi il est nécessaire d'étudier et de repenser leur architecture, pour le bonheur des consommateurs et des tendances actuelles et futures.

1.3. Le débourrement des bourgeons axillaires de rosier

La ramification des plantes est un trait agronomique majeur puisqu'elle influence grandement le rendement final de la plante, intervient dans l'acquisition de la qualité des productions et la qualité visuelle des plantes ornementales, notamment le rosier. La ramification résulte de la capacité d'un bourgeon végétatif à débourrer et s'allonger pour élaborer un axe.

Les bourgeons axillaires sont des tiges feuillées à l'état miniature comprenant un méristème, des entre-nœuds courts et des feuilles immatures (Wang *et al.*, 2021). La croissance de ces bourgeons est inhibée par l'apex de la pousse, par le mécanisme de la dominance apicale. La dominance apicale est le terme utilisé pour décrire le contrôle de la tige principale sur l'excroissance des bourgeons axillaires.

La dominance apicale ainsi que sa levée se caractérise selon 4 étapes (Cline, 1997) :

1- La formation du bourgeon axillaire, 2- Une mise en place éventuelle de dormance, 3- Une levée de dormance du bourgeons axillaire, 4- Une croissance du bourgeon pour élaborer un nouvel axe (Figure 2).

La dominance apicale est donc fortement liée à la ramification, puisque repose sur la capacité d'un bourgeon axillaire à débourrer. La dormance est complexe et comprend des endo-, para- et éco-dormances, qui peuvent se chevaucher (Lang *et al.*, 1987).

L'endo-dormance est contrôlée par des mécanismes endogènes au bourgeon, tandis que la para-dormance est due au contrôle d'autres organes sur un bourgeon donné, comme c'est le cas en dominance apicale. Dans le cas du rosier, l'endo-dormance n'existe pas. L'éco-dormance quant à elle, repose sur le contrôle environnemental d'un bourgeon (Ricard, 2015). La capacité des bourgeons à se développer est donc contrôlée à la fois par des facteurs internes et externes tels que la lumière. La capacité d'un bourgeon à débourrer dépend donc de facteurs endogènes tels que les hormones dont l'auxine, ou bien du métabolisme primaire tel que la production de sucres (Mallet *et al.*, 2022).

² Société Nationale d'Horticulture de France

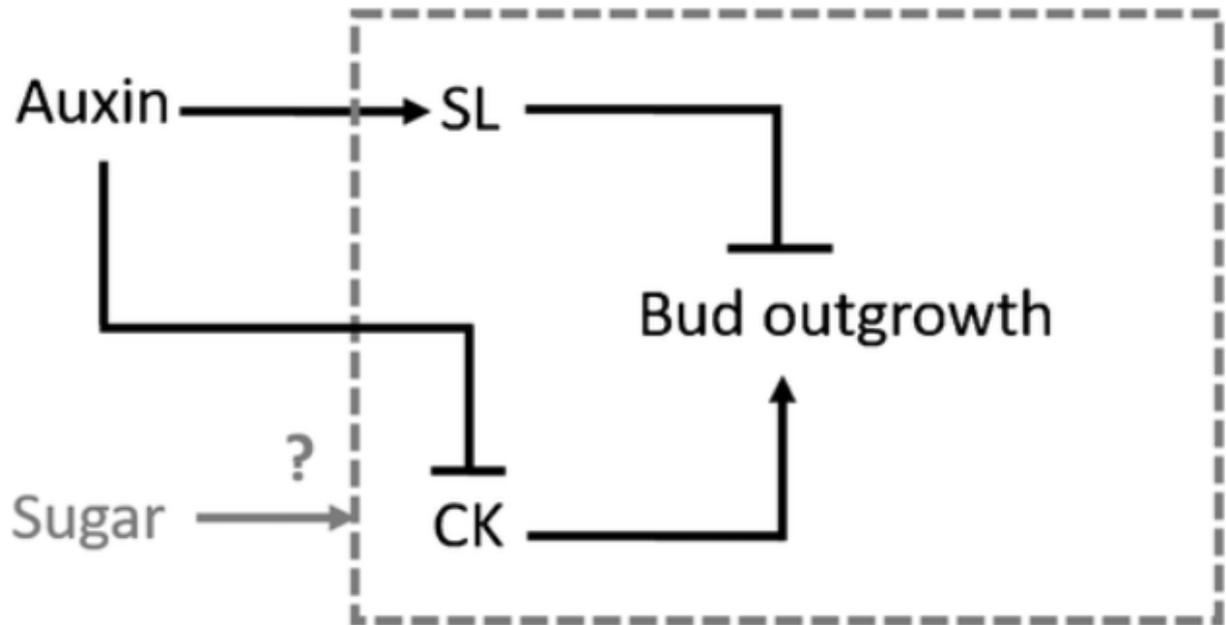


Figure 3 : Influence de l'auxine sur le débourrement de bourgeons (Bertheloot et al., 2020).

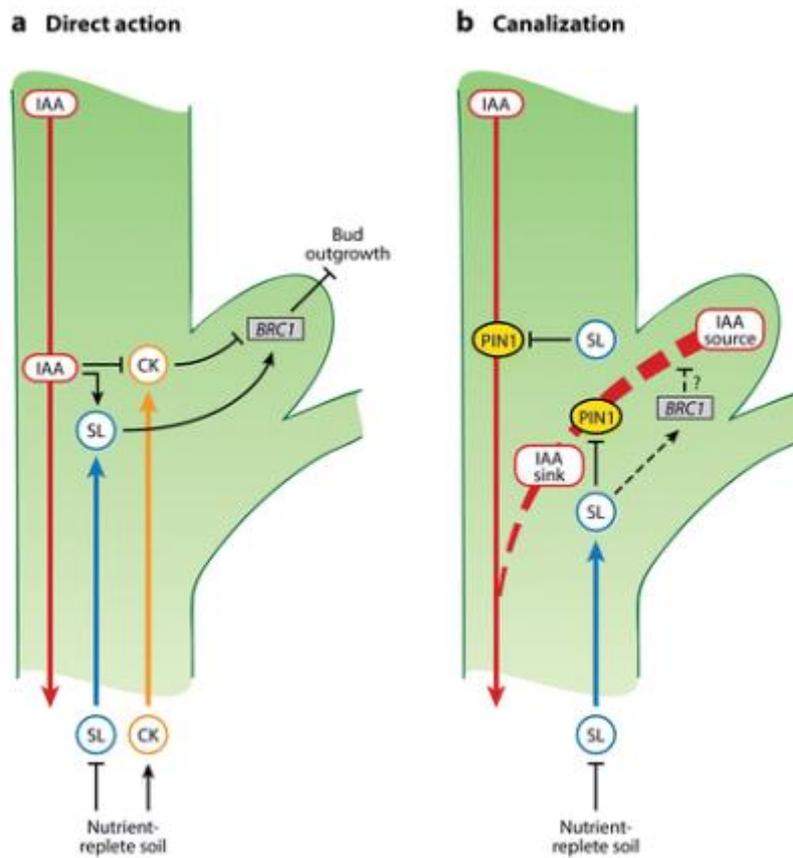


Figure 4 : Modèle d'action de l'auxine sur le débourrement (a : modèle sur les seconds messagers ; b : modèle sur la canalisation de l'auxine) (Waters et al., 2017).

1.4. Implication de facteurs endogènes et environnementaux dans le contrôle du débourrement

1.4.1. Les facteurs hormonaux

L'auxine, ou indole-3-acide acétique (IAA), est la première hormone identifiée comme étant impliquée dans le processus de dominance apicale (Thimann, 1939). L'auxine est produite dans la région apicale et transportée vers le bas à travers la tige. Il a été établi que l'auxine issue du bourgeon apical est incapable de rentrer dans les bourgeons axillaires pour exercer son pouvoir inhibiteur (Booker, Chatfield and Leyser, 2003). Elle agit selon deux modèles d'action qui ne sont pas mutuellement exclusif : 1- celui des seconds messagers qui implique deux hormones (des cytokinines (CK) et des strigolactones (SL) (Figure 3)) capables d'agir directement dans le bourgeon ; 2- celui de la canalisation de l'auxine qui repose sur le fait que le bourgeon est capable d'exporter sa propre auxine, ce qui permet le débourrement. L'auxine ne pouvant être transporté en grande quantité de la tige aux bourgeons, ne peut pas réguler directement l'expression de *BRC1* (Hall and Hillman, 1975). Ainsi, l'auxine favorise indirectement l'expression de *BRC1* dans le bourgeon (Aguilar-Martínez, Poza-Carrión and Cubas, 2007).

L'IAA, les CK et les SL (Figure 4) sont impliquées dans la régulation hormonale de l'expression de *BRANCHED 1 (BRC1)*. Dans ce réseau de régulation, l'auxine et les strigolactones agissent comme des inducteurs tandis que les Cytokinines agissent comme des répresseurs de l'expression de *BRC1* (Rameau et al., 2015). Les cytokinines favorisent la croissance des bourgeons, tandis que l'auxine diminue les niveaux systémiques des cytokinines, ce qui inhibe indirectement la croissance des bourgeons (Müller and Leyser, 2011).

L'Acide Abscisique (ABA) peut quant à lui inhiber indirectement la croissance des bourgeons axillaires par la répression de la synthèse des CKs et l'induction des SLs (Brewer *et al.*, 2009). Chez le rosier, une synthèse continue d'ABA contribue au maintien de l'endo-dormance des bourgeons par le contrôle de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 (Mallet *al.* 2022). Bien que l'IAA, les CK et les SL aient un rôle important dans la régulation hormonale de la croissance des bourgeons, les gibbérellines (GA) pourraient quant à elle être impliquées dans la régulation de l'expression de *BRC1*. Les GA sont des hormones végétales qui régulent divers processus de développement, tels que la germination, la dormance, l'élongation des entrenœuds. Chez *Rosa sp.*, la biosynthèse des GA augmente fortement lors de l'excroissance des bourgeons (Roman *et al.*, 2016).

1.4.2. Rôle de *BRC1*

La ramification est un processus clé pour la croissance et qui contribue à élaborer la forme des plantes. Les axes nouvellement produits résultent du développement des bourgeons axillaires, qui est en partie médiée par la régulation de l'expression du gène *BRANCHED 1 (BRC1/TB1)*. Le gène *BRC1* code un facteur de transcription (TCP), qui inhibe la croissance des bourgeons (Wang et al., 2019a).

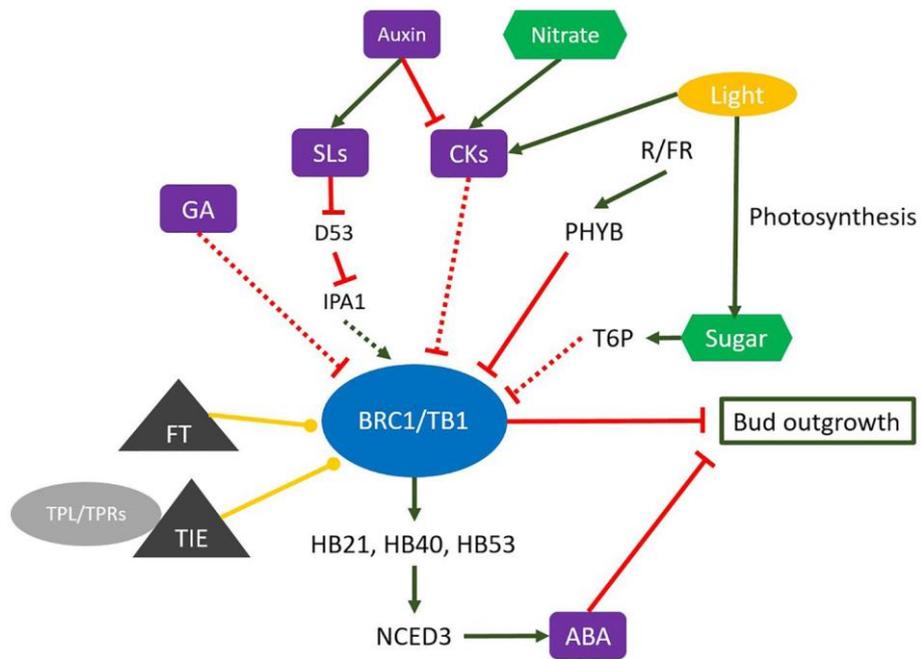


Figure 5 : De nombreux facteurs influencent l'expression de BRC1, notamment des facteurs développementaux, génétiques, hormonaux, des signaux de sucre et des facteurs environnementaux (Wang et al., 2019).

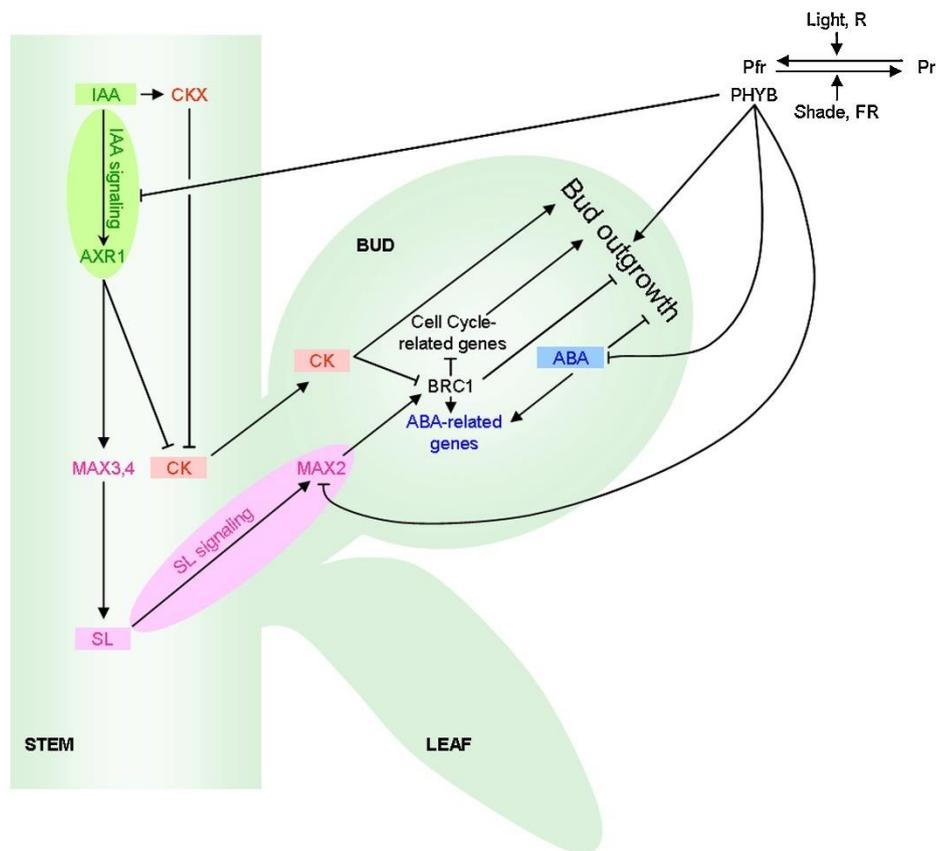


Figure 6 : Représentation schématique du réseau impliqué dans la régulation de la croissance des bourgeons par PHYB (Demotes-Mainard et al., 2016).

Les gènes TCP³ agissent généralement en régulant positivement ou négativement le cycle cellulaire (Wang et al., 2019). *BRC1* est donc considéré comme un pilier essentiel des signaux contrôlant la capacité d'un bourgeon à se développer, notamment chez le rosier (Rameau et al., 2015).

Le gène *BRC1* de *Rosa hybrida*, fortement exprimé dans les bourgeons dormants, est l'homologue du gène *BRC1* d'*Arabidopsis thaliana* (Barbier et al., 2015). C'est pourquoi, les études menées lors de ce stage seront appliquées sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana*.

En conclusion, le débourrement est contrôlé par une panoplie d'interaction complexe de plusieurs facteurs endogènes (Figure 5). Les hormones, notamment les cytokinines (CK), les strigolactones (SL) et l'auxine (IAA) sont des facteurs déterminants de la dominance apicale et du débourrement des bourgeons, de *Rosa 'Radrazz'* et d'*Arabidopsis thaliana* plus particulièrement.

1.4.3. Rôle de la lumière

La lumière est l'un des facteurs environnementaux les plus importants influençant le débourrement de bourgeons. Chez le rosier, l'éco-dormance liées aux conditions lumineuses est particulièrement forte, et cela, grâce à des effets de qualité et de quantité. La lumière rouge claire (R autour de 600 nm) induit le débourrement tandis que celle en rouge sombre (RS autour de 730 nm) l'inhibe (Girault, 2009). Le signal lumineux est notamment perçu par le phytochrome B (PHYB), qui capte la lumière R et RS (Figure 6). Une perte de fonction du PHYB chez *Arabidopsis* peut entraîner une ramification réduite, suggérant son rôle dans le débourrement (Leduc et al., 2014).

La lumière R perçue par le PHYB va donc activer le photorécepteur et promouvoir le débourrement tandis que la lumière RS l'inactive. Il a été observé que la quantité dans les feuilles d'acide abscissique augmentait lors d'une perte de fonction de *phyb* (González-Grandío et al., 2013). Le gène inhibant le débourrement, *BRC1*, participerait à la voie de signalisation de la lumière via PHYB (Demotes-Mainard et al., 2016). Ainsi, l'expression de *BRC1* est induite lorsque de la lumière RS est ajoutée à de la lumière blanche, en inhibant le débourrement (Demotes-Mainard et al., 2016)

Concernant la quantité de lumière, une forte intensité génère chez le rosier une activation du débourrement. Cette plante a un besoin absolu de lumière, l'obscurité inhibant totalement son débourrement. Ainsi, le rosier est un excellent modèle d'étude pour explorer le photo-contrôle du débourrement des bourgeons chez les plantes, notamment ornementales (Leduc et al., 2014).

³ Teosinte **Cycloidea Proliferating Cell Factors**

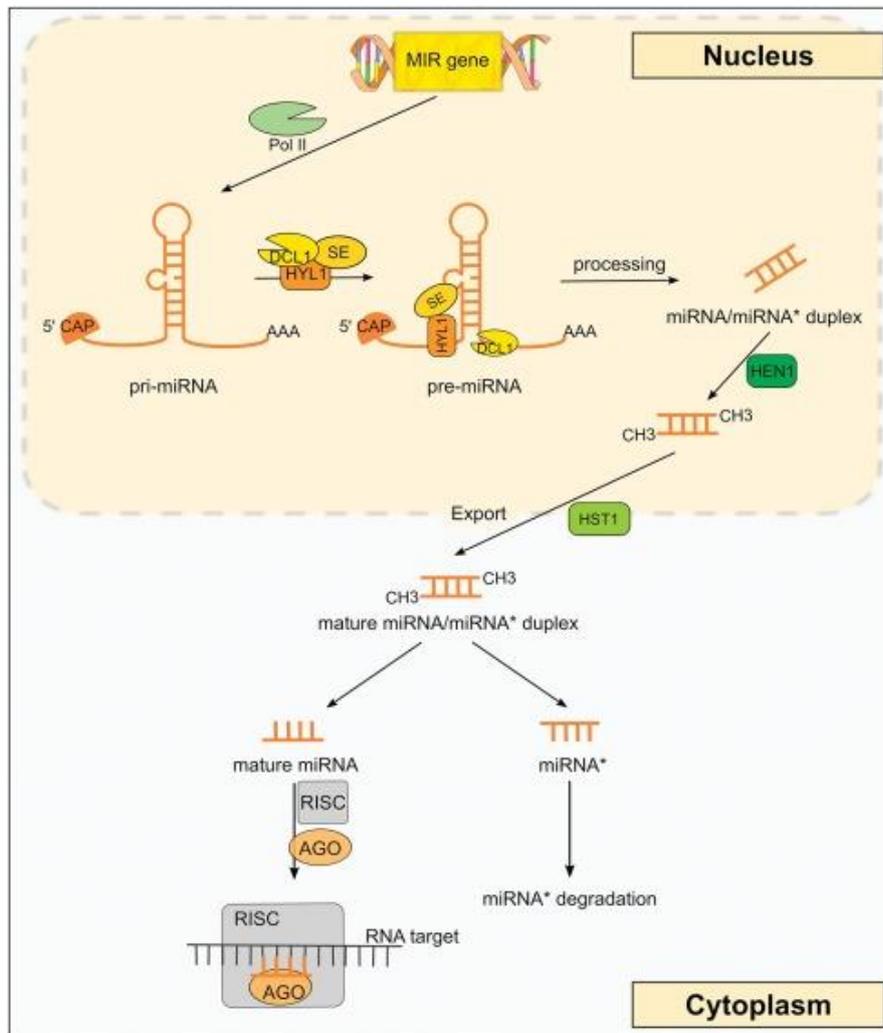


Figure 7 : Biogenèse et modes d'action des miARNs chez les plantes (Pagano et al., 2021)

1.5. Régulation post-transcriptionnelle par les microARNs

1.5.1. Les miARNs

Les micro-ARNs (miARNs) sont une classe de petits Acides RiboNucléiques (19 à 25 nucléotides) simples brins, jouant un rôle essentiel dans la stabilité du génome, la signalisation et la communication cellulaire (Varkoniy-gGasic, 2011). Ces miARNs ont été découverts en 1993 chez un nématode, *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (Lee *et al.*, 1993).

Chez les plantes, Les miARNs répriment l'expression des gènes en agissant sur des séquences complémentaires dans la région codante de l'ARNm pour guider le clivage et la répression de la traduction (Varkoniy-Gasic, 2011).

1.5.2. Voie de Biosynthèse

Il existe une voie de biosynthèse des miARNs chez les plantes (Figure 7). Les gènes produisant les miARNs sont transcrits par la RNA polymérase II, en une première structure de miARN : le miARN primaire (pri-miARN). Par la suite, ces pri-ARNs sont clivés par la protéine DICER-LIKE1 (DCL1), à l'aide des protéines SERRATE (SE) et HYPOPLASTIC LEAVES 1 (HYL 1), formant ainsi des précurseurs avec une structure en épingle à cheveux (pré-miARNs). Ceux-ci sont à nouveau clivés par DCL1, de la base vers la boucle et forment des miARNs matures (Pagano *et al.*, 2021). Les précurseurs étant méthylés au niveau des extrémités 3', ils seront stabilisés par la protéine HEN1 (Budak and Akpinar, 2015). Une fois exporté dans le cytoplasme, les deux brins des miARNs matures se sépareront. L'un des brins s'associe au complexe RNA-induced silencing complex (RISC) grâce à son interaction avec la protéine argonaute (AGO1) (Suarez *et al.*, 2015).

Ainsi, les miARNs répriment l'expression des gènes et permettent soit le clivage d'ARNm ou bien la répression de la traduction de gènes cibles, ou plus généralement des gènes codant des facteurs de transcription. Cette étape est donc nécessaire pour que les miARNs matures puissent agir sur les transcrits cibles, jouant alors un rôle majeur dans le développement de la plante.

1.5.3. Les miARNs identifiés comme potentiellement exprimés différemment dans le processus de photocontrôle

Quelques études récentes ont identifié le rôle de certains miARNs avec leurs gènes cibles (miRNAs/ARNm). Conventionnellement, pour les miARNs, les appariements Guanine-Uracile (G-U), ne vont compter que pour un demi-mismatch⁴. Ainsi, les miARNs sont capables de s'apparier à plusieurs de leurs cibles avec quelques mismatches et ce grâce à plusieurs appariements G-U (Vroland, 2016). Une analyse par séquençage de petits ARN (small RNA seq) a permis de découvrir à l'issue de la transcription des miARNs exprimés différemment dans les bourgeons dormants et non dormants. Ceux-ci auraient un lien avec la division cellulaire et l'élongation.

⁴ Score d'alignement de séquences permettant de distinguer les lettres différentes les unes des autres. Evalue la ressemblance globale entre deux séquences, sur toute la longueur.

Les miARNs identifiés à l'issue du smRNAseq dans le cadre de la thèse de Julie Mallet sont le *miARN319a1.1* et le *miARN319a1.2*. La famille des miARN319 cible un groupe de gène de la famille des facteurs de transcription TEOSINTE BRANCHED1/CYCLOIDEA/PCF (TCP). Chez le rosier, ces miARNs ciblent le TCP2 et TCP4 tandis que ceux d'*Arabidopsis thaliana* en ciblent 3 de plus (TCP3, TCP10 et TCP24).

TCP⁵ est un acronyme du nom des gènes isolés de 3 espèces : du maïs (*Zea mays*), du muflier (*Antirrhinum majus*), et du riz (*Oryza sativa*) (Lan and Qin, 2020).

La famille des miARN319 cible principalement 5 des CIN-like TCP chez *Arabidopsis thaliana*, en agissant en tant que répresseur du débourrement (Li, 2015). Ainsi, l'expansion cellulaire et le développement des jeunes feuilles sont inhibés. Ces 5 CIN-TCP possèdent une séquence ciblant le miR319 au niveau de l'extrémité 3' des transcrits dans presque tous les groupes d'angiospermes (Lan and Qin, 2020). Chez *Arabidopsis thaliana*, le gène TCP4 active la transcription du gène YUCCA5, gène de synthèse de l'auxine (Lan and Qin, 2020).

1.6. Missions confiées et démarches adoptées pour atteindre l'objectif du stage

Ce mémoire s'appuie sur un travail de thèse menée par Julie Mallet. Il a pour but de consolider ses résultats concernant le rôle du photo-contrôle dans la régulation post-transcriptionnelle des microARNs lors du débourrement de bourgeons chez l'espèce modèle Rosa « Radrazz ». Ce projet a pour but de caractériser et identifier des facteurs tels que les miARNs influençant l'architecture de la plante.

L'objectif visé est de prouver que certains microARNs sont différenciellement exprimés, selon la condition de lumière, tout en ayant un lien avec le débourrement des bourgeons. Deux précurseurs *RhmiR319a1.1* et *RhmiR319a1.2* sont visés en raison d'études menées sur le microARN mature. Effectivement, lors de la thèse de Julie Mallet, le miARN s'exprimait différenciellement selon les conditions de lumière à différents temps après décapitation. De plus, l'expression du miARN mature miARN319 était en corrélation négative avec celle du facteur de transcription de type TCP. Cette étude a donc eu pour but d'approfondir les connaissances sur ce miARN en allant en plus loin dans la voie de signalisation.

Une autre des missions confiées lors de ce stage a été la mise en culture de 5 lignées transgéniques et 1 lignée sauvage d'*Arabidopsis thaliana*. Une moitié de cette culture a été utilisée pour le phénotypage, afin de remarquer de potentielles différences significatives quant au développement de la plante, tandis que l'autre moitié a été utilisée pour des analyses de biologie moléculaire. Ces analyses permettront d'identifier de possibles différences entre l'expression d'ARNm à un temps donné après décapitation. Des comparaisons pourront être effectuées entre une même lignée.

Ce projet concerne des aspects économiques puisque la gestion de cette architecture est coûteuse en main-d'œuvre ou en intrants, et a donc un impact environnemental néfaste. Les miARNs pourraient constituer des outils d'intérêt pour maîtriser l'architecture d'une plante.

⁵ TEOSINTE BRANCHED1 (TB1), CYCLOIDEA (CYC) et PROLIFERATING CELL FACTOR 1 et 2 (PCF1 et PCF2)

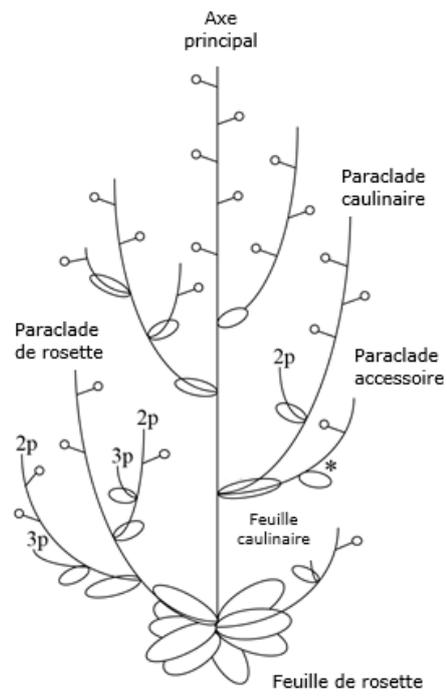


Figure 8 : Schéma représentant la dénomination des différents organes et axes pour l'analyse phénotypique.
 Dessin selon (Talbert et al., 1995), ré-interprété par (Mallet, 2022) (2p : paraclade d'ordre 2 ; 3p : paraclade d'ordre 3).

2. Matériel végétal et culture des plantes

2.1. Culture d'*Arabidopsis thaliana*

Les plantes transgéniques et WT⁶ utilisées pour la culture d'*Arabidopsis thaliana* sont de l'écotype sauvage Col0. Il y a eu au total 166 godets, avec 6 lignées différentes, dont 5 transgéniques. Le mutant *Jaw-D* est un surexpresser du miARN319, lui conférant des feuilles dentelées et recourbées (Lan and Qin, 2020). Le mutant *soj8* d'*Arabidopsis thaliana* quant à lui contient une mutation ponctuelle dans le site cible du *Ath*miARN du gène TCP4. Ainsi, *soj8* est moins sensible à l'action du miARN319, puisque cette mutation diminue leur l'interaction (Palatnik *et al.*, 2007). Les autres mutants, *ox319a1.1A1*, *ox319a1.1E1* et *ox319b1D5* expriment de manière ubiquitaire ces miARN319s, respectivement.

Ainsi, ces plantes ont été semées et transférées en chambre froide durant 3 jours, puis dans une salle dédiée aux plantes mutantes, ou de quarantaines. La chambre de culture des plants d'*Arabidopsis thaliana* était sous certaines conditions : Une température de 21°C, une Humidité Relative de 60% avec une intensité lumineuse de 152 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Le PAR est donc faible, et les jours sont longs. Les plantes d'*Arabidopsis thaliana* ont été cultivées en jours longs (photopériode de 15 heures jour et 9 heures nuit).

12 plantes par lignées ont été utilisées pour étudier le phénotypage, qui a commencé 21 jours après le semis. Les plantes restantes ont servi au prélèvement de cœur de rosette en vue d'études de biologie moléculaire. Une fois que la hampe florale de chaque plante utilisée pour la biologie moléculaire est visible, le cœur de rosette est prélevé, le jour-même où la hampe est apparue (t_0), ou bien 2 jours après (t_2). Le prélèvement s'effectue à l'aide d'une lame de rasoir, afin de ne garder que le cœur de rosette, sans la hampe florale et les feuilles. Le cœur de rosette servira à identifier des potentiels différences d'expression de gène cible ou bien de gène marqueur tel que *BRC1*.

Les bourgeons sont ainsi prélevés, afin d'analyser la présence possible de miARNs. Cela permettra d'identifier de potentielles différences d'expression entre les lignées, et entre les temps de développement de la hampe florale.

2.2. Analyses phénotypiques

Afin d'étudier le phénotype de ramification des différentes lignées d'*Arabidopsis thaliana*, les éléments suivants ont été dénombrés : le nombre de feuilles et paraclades de rosette, le nombre de feuilles et paraclades caulinaires et de ramifications secondaires. La taille finale de la plante, la taille des feuilles et de la hampe florale ont été mesurées (Figure 8). La date d'apparition de la ramification primaire pour chaque plante a été annotée. Le comptage des feuilles de rosette est stoppé dès que la hampe florale a atteint 1 cm.

⁶ Wild Type

2.3. Conception des amorces pour la RT-qPCR

Des analyses bio-informatiques ont dû être effectuées en amont des expériences afin de commander des couples d'amorces, pouvant être spécifiques du gène codant le miARN et son précurseur. Afin de vérifier les résultats obtenus par Julie Mallet lors de sa thèse, les séquences de gènes candidats (*RhmiARN319a1.1* et *RhmiARN319a1.2*) ont été recherchés à l'aide du génome du rose (JBrowse accessible sur <https://www.rosaceae.org/tools/jbrowse>). Un alignement des séquences à l'aide de ClustalW (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) a permis de trouver des amorces spécifiques pouvant s'hybrider au Primaire et au Précurseur des miARNs. Lorsque certaines séquences sont fortement similaires, il est préférable de trouver des amorces ne s'hybridant pas ou peu avec sur le miARNs non souhaités. A l'aide de primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), des amorces ont été choisies selon leurs taux en GC (compris entre 40 et 60%), leur Tm⁷ (compris entre 52 et 63°C, mais n'ayant jamais un écart de température supérieur à 3°C) et selon leur Self Complementary, qui doit être au plus proche de 0. Une vérification visuelle des amorces Forward et Reverse potentielles a été effectuée) l'aide de JBrowse.

2.3.1. Conception des amorces des primaires et des précurseurs miARNs pour l'amplification par qPCR

Les séquences de l'ensemble des amorces (Eurofins Genomics) utilisées pour la RT et la qPCR sont présentées en Annexe I. Les amorces RT permettent une rétrotranscription sensible et spécifique des miARNs cibles extraits, ainsi que de contrôles internes l'ubiquitine (UBC). La méthode de rétrotranscription utilisée est la Random Poly dT. Ainsi, l'amplification sera faite au hasard.

L'amorce RT à boucle souche est hybridée avec une molécule d'ARNm spécifique, puis transcrit à l'envers dans une réaction RT pulsée. Ensuite, le produit de la RT est amplifié à l'aide d'une amorce directe spécifique au miARN et de l'amorce inverse universelle. Le produit peut être visualisé par électrophorèse sur gel lors de l'amplification, dans le but de vérifier si la rétrotranscription a permis ou non le passage d'ARN en ADN complémentaire (ADNc).

2.3.2. Transcription reverse des miARNs

La méthode de détection par transcription inverse en chaîne (RT-PCR) est très sensible, spécifique, rapide et nécessite de petites quantités d'ARN pour l'analyse. La synthèse d'ADNcomplémentaire (ADNc) se réalise à partir de 500 ng d'ARNs totaux extraits ultérieurement des bourgeons. Les ARNs sont repris dans un volume total de 16µL avec de l'eau RNase-free. Chaque échantillon d'ARN est mélangé à un mix de RT. Pour ce faire, le Supermix de transcription inverse iScript pour RT-qPCR a été utilisé. Ce Supermix pré-mélangé contient tous les composants nécessaires à l'exception de la matrice d'ARN, pour effectuer la synthèse d'ADNc du premier brin de façon aléatoire. Il fonctionne avec une large gamme dynamique linéaire d'ARN totale d'entrée (1µg-1pg) et permet une détection sensible des gènes cibles avec de faibles niveau d'expression. Ainsi, 4 µL de iScript RT supermix a été ajouté pour un volume total de 20µL. Le cycle de réaction RT est de 5 minutes à 25°C, 20 minutes à 46°C puis 1 minute à 95°C.

⁷ Melting Temperature (Température de fusion moléculaire)

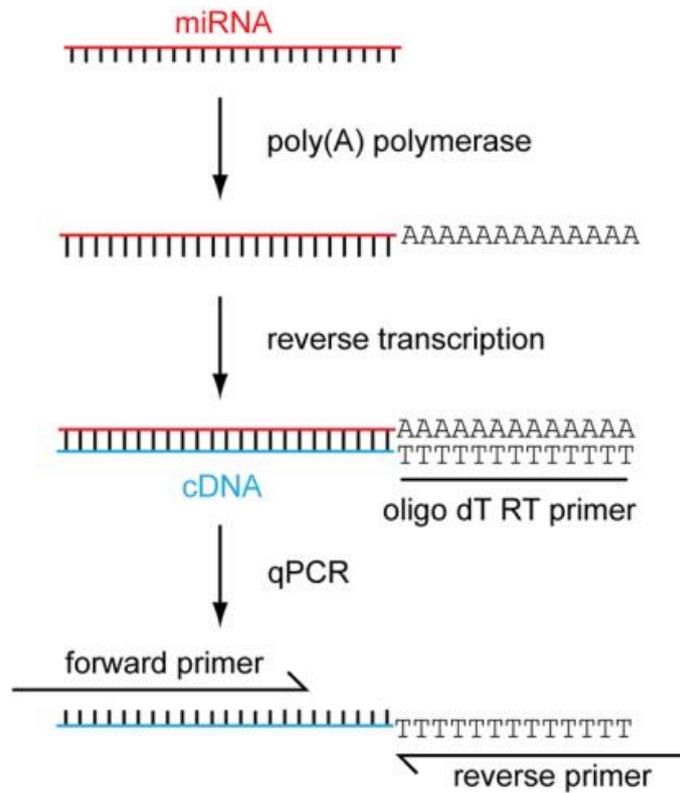


Figure 9 : Méthodes de détection et de quantification des miARN par RT-qPCR. Tous les miARN sont polyadénylés par la poly(A) polymérase. Les miARN à queue sont ensuite transcrits en utilisant une stratégie d'amorçage oligo dT. L'ADNc résultant est amplifié à l'aide d'amorces spécifiques (contenant souvent des nucléotides LNA pour augmenter l'amorce T m). La réaction PCR est surveillée en temps réel à l'aide du SYBR Green qui devient fluorescent lorsqu'il est lié à l'ADN double brin (Roberts et al., 2014).

2.3.3. Vérification de la pureté par RT-PCR

La PCR suivie d'une électrophorèse permet de vérifier si la RT a bien permis la transcription réverse des miARNs. Les échantillons de la RT ont été mélangés à un mix de PCR.

Pour 1 échantillon, le mix se compose de : 11.04µL d'eau milliQ, 4µL de tampon5X, 0.04µL de dNTP, 1.3µL de MgCl₂, 0.06µL de GoTaq et 0.6µL d'amorces Forward et Reverse (Figure 9) de GAPDH. Les amorces sont toutes deux à une concentration de 10µM et sont de part et d'autre l'intron. 18µL de ce mix est déposé dans des tubes PCR avec 2µL de ADNc mère. Le programme du thermocycleur est de 4 minutes à 94°C, suivi de 35 cycles de 25 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C et 1 minute à 72°C. Le cycle se finit par 6 minutes à 72°C et une température finale de 10°C, en continue.

Les produits de PCR sont par la suite déposés sur un gel. Dans ce cas, le gel est à 1.5% d'agarose puisque l'on étudie des ADNc. Une fois sous la hotte, 2µL de Sight DNA Stain est dilué au 50^{ème} dans la solution d'agarose à 70 mL. Le mélange est ensuite déposé dans le système de coulage MUPID. Il est possible l'installer dans l'électrophorèse 20 minutes plus tard. 4µL de Ladder à 100pb est déposé dans le premier puit (référence) et 20µL des ADNc issus de la PCR dans les autres puits. L'électrophorèse est mise en route durant 25 minutes à 100V.

2.3.4. Mesure des transcrits par RT-qPCR

A la suite de la vérification de la pureté des ADNc, il est possible d'effectuer une qPCR. Les échantillons issus de la RT ont dû être dilués au 50^{ème}, tout comme l'UBC (gène de référence) et les amorces des gènes d'intérêt ont dû être diluées au 10^{ème}. Le mix de qPCR pour un puit se compose de 7µL d'eau milliQ, 4µL de SYBER Green et 0.5µL des amorces Forward et Reverse du gène. Au total, 3µL d'ADNc et 12µL du mix de qPCR ont été déposés par puits, en sachant que 3 répétitions techniques ont été effectuées.

L'analyse des résultats de qPCR se fait sur plusieurs critères, dont l'aspect des melting curves, qui renseignent sur la qualité du résultat observé. Elles doivent ne présenter qu'un seul pic bien défini pour un seul gène et non plusieurs, signe d'une contamination ou bien d'une mauvaise analyse.

Les Cq des réplicats techniques doivent être proches, de façon qu'il n'y ait qu'un Cq de différence entre eux. La valeur de Cq⁸ est le nombre de cycles de PCR auquel la courbe de réaction de l'échantillon croise la ligne de seuil. Le Cq permet de détecter un signal réel à partir de l'échantillon. Plus le Cq est élevé, moins l'ADNc détecté est présent, car il faut plus de cycles PCR pour pouvoir détecter l'amplification fluorescente. Si le Cq a une petite valeur, le gène est fortement exprimé.

Finalement, l'analyse de l'expression des gènes d'intérêt se fait en fonction d'un contrôle interne (gène de référence) et par rapport à un contrôle interne (la condition à laquelle on veut comparer les autres points). La formule $[E_i^{(Cq\ ref - Cq\ échantillon)}] / [E_r^{(Cq\ échantillon - Cq\ ref)}]$ permet de calculer l'expression relative d'un échantillon. E_i et E_r désignent les efficacités des couples d'amorces du gène d'intérêt et du gène de référence, respectivement. « ref » indique l'échantillon auquel se réfèrent tous les autres.

⁸ Cycle de quantification

2.4. Analyses statistiques

Le protocole statistique s'est appuyé sur le script de Julie Mallet, utilisé lors de sa thèse, et lors de la vérification des résultats concernant l'expression des miARNs (Annexe II).

Des analyses statistiques ont été effectuées sur les résultats issus de plusieurs réplicats biologiques et ou techniques pour les résultats d'expression de gènes. Des analyses de normalité (test de Shapiro) et homoscedasticité des variances (Bartlett) sont réalisées, afin de savoir si des tests paramétriques ou non paramétriques doivent être exécutés. Si les hypothèses de normalité et d'homoscedasticité des variances (H_0 , $p\text{-value} > 0,05$) sont validées, alors une analyse multivariée ANOVA est réalisée, suivie d'un test de comparaison multiple LSD.test ou bien d'un test post-hoc d'une comparaison deux à deux par le test de Student ($p\text{-value} \leq 0,05$). Dans le cas contraire, des tests non paramétriques sont réalisés à l'aide du test de Kruskal-Wallis, une analyse multivariée, et une comparaison deux à deux par le test de Wilcoxon ($p\text{-value} \leq 0,05$). Ces analyses ont toutes été réalisées sous le logiciel Rstudio.

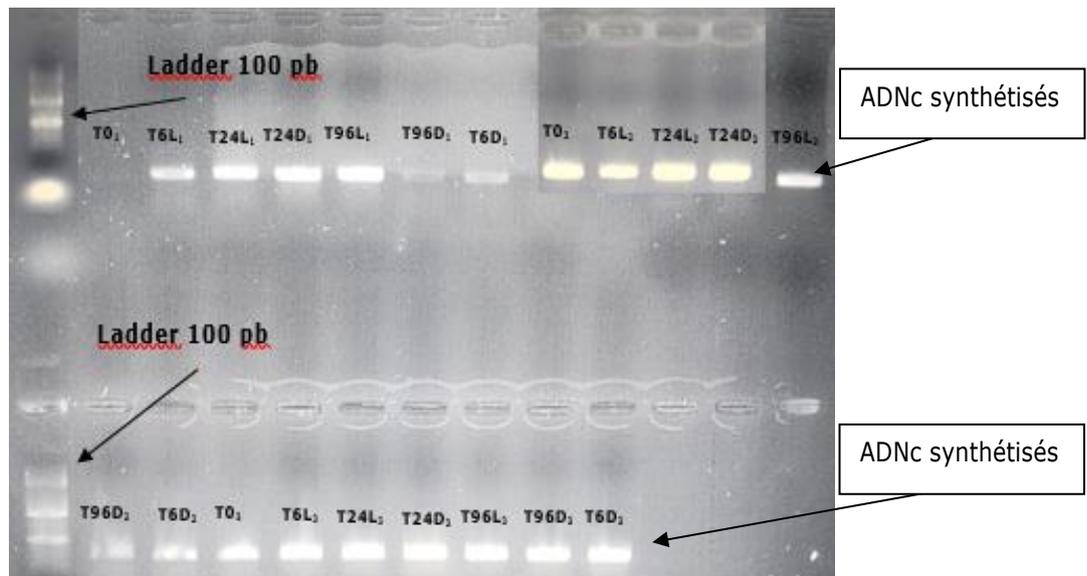


Figure 10 : Profils d'électrophorèse de différents échantillons d'ADNc provenant des ARNs extraits par Julie Mallet de Rosa « Radrrazz ». Profils d'électrophorèse de différents échantillons d'ADNc provenant des ARNs extraits par Julie Mallet de Rosa « Radrrazz ». Les divers temps cinétiques sont indiqués au-dessus des bandes d'électrophorèse, L pour Lumière, D pour Obscurité. Les trois bandes pour chaque même condition correspondent aux 3 lots d'ADNc. La flèche désigne le ladder 100 pb utilisé sur le gel (Photo : MG).

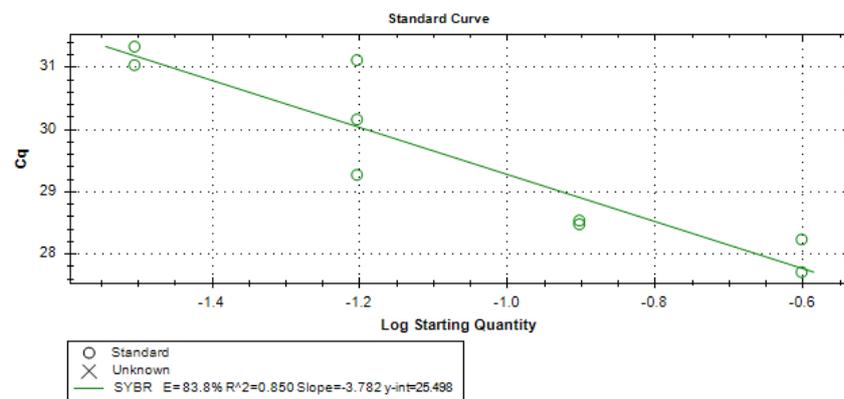


Figure 11 : Efficacité des amorces du précurseur de miR319a1.1 selon différentes dilutions (4ème, 8ème, 16ème et 32ème).

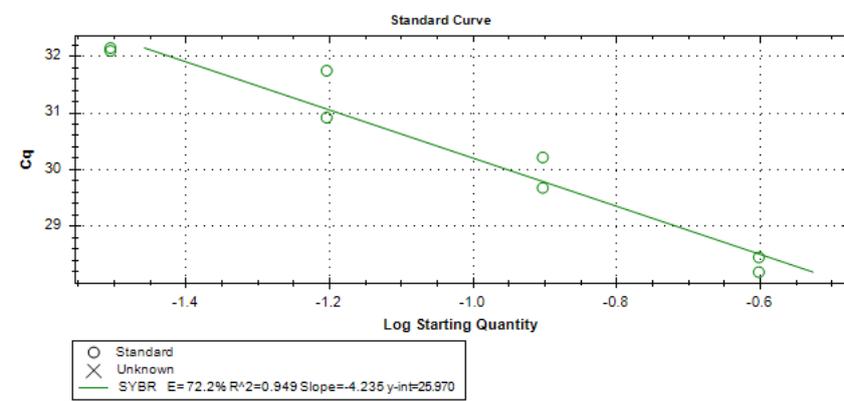


Figure 12 : Efficacité des amorces du précurseur de miR319a1.2 selon différentes dilutions (4ème, 8ème, 16ème et 32ème).

3. Résultats

3.1. Vérification qualitative et quantitative des ARNs totaux extraits

3.1.1. Nanodrop

Le spectrophotomètre UV-Visible a permis d'effectuer une vérification qualitative et quantitative des miARNs obtenus un an auparavant par Julie Mallet lors de sa thèse. Celui-ci indique deux ratios (260/280 et 260/230) pouvant fournir des informations concernant la contamination de l'échantillon, en protéine et en polyphénol, respectivement. Ils doivent être compris entre 1,8-2,2.

Une quantité d'ARN a été prélevée afin d'obtenir un total de 500ng d'ARN pour un volume final de 16µL (Annexe III). Un volume précis d'ARN a donc été prélevé afin d'avoir les mêmes quantités pour chaque échantillon lors de la Rétro-Transcription (RT).

3.2. Vérification qualitative des ADNc issus de la RT

3.2.1. Migration sur gel d'agarose

Le profil de migration sur gel des ADNc synthétisés de GAPDH lors de la RT présente des bandes nettes (Figure 10). L'absence de bandes près de la zone de dépôt confirme que tous les ARNs ont été rétro-transcrits en ADNc et qu'il n'y a aucune présence d'ADN génomique. Ainsi, il est possible d'effectuer une qPCR afin de visualiser l'expression des miARNs.

3.2.2. Test efficacité

Avant d'analyser les échantillons, il faut vérifier l'efficacité des amorces, qui peut être obtenues par qPCR. Les efficacités des amorces de précurseurs des miR319a1.1 et miR319a1.2 ont été effectuées même si elles avaient déjà été analysées par Julie Mallet lors de sa thèse. L'efficacité est un facteur clé dans la détermination de la sensibilité d'une réaction et dépend principalement du couple d'amorces utilisé et de la température à laquelle l'hybridation des amorces avec la matrice est réalisée.

Le pourcentage d'efficacité du couple d'amorces pour le pré-mi319a1.1 est de 102,2%, ce qui indique que l'efficacité est de 2,02 (Figure 11). De même pour le pourcentage d'efficacité du pré-319a1.2, qui est de 85,8% (Figure 12). Ainsi, l'efficacité du couple d'amorces servant à amplifier le précurseur du miARN319a1.2 est de 1,858. L'efficacité devant être compris entre 1,7 et 2,2, ces données d'efficacité permettent de continuer les manipulations en laboratoire, et de tester ces amorces sur les échantillons conçus lors de la RT.

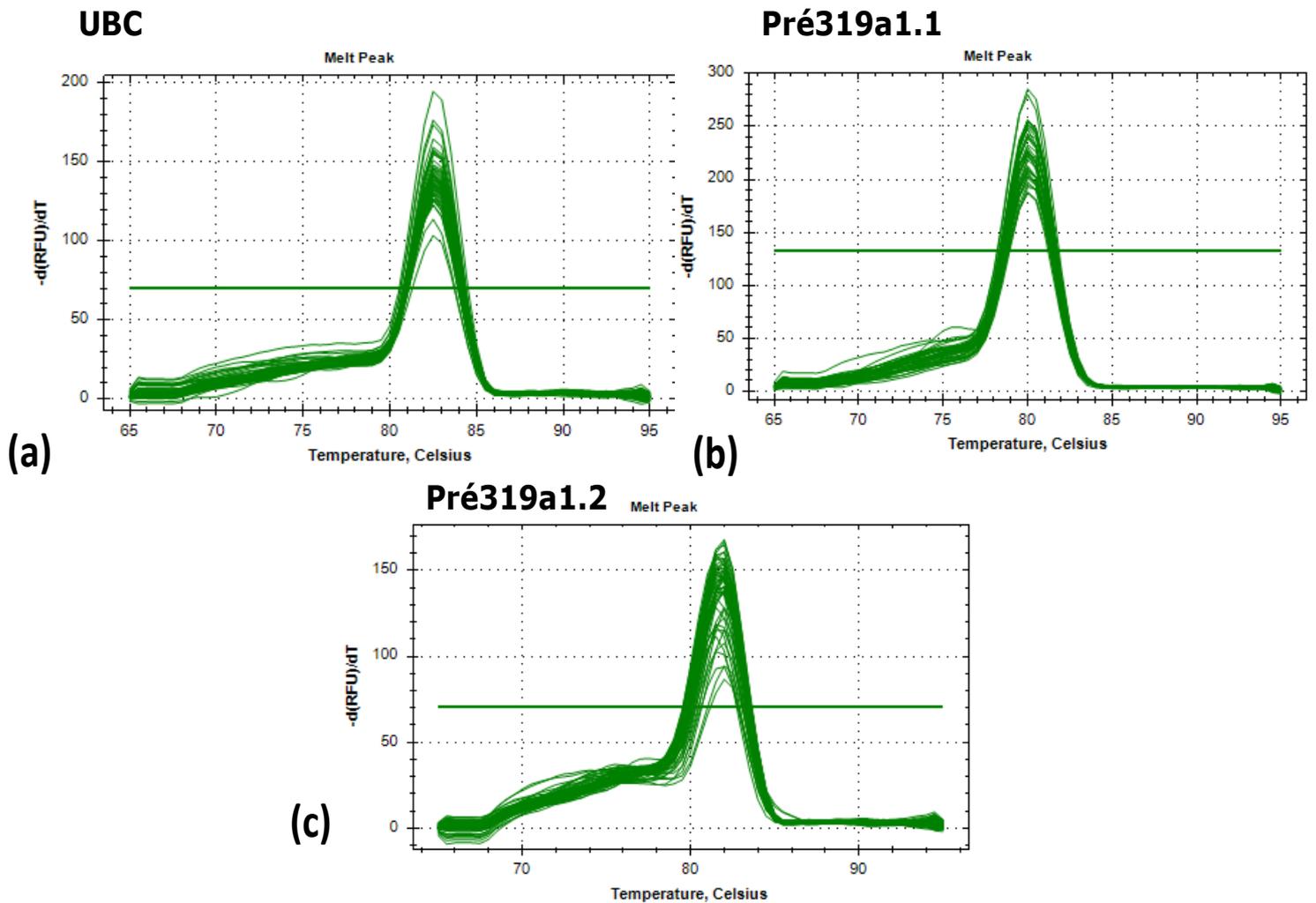


Figure 13 : Melting curves obtenues sur échantillons d'ADNc issus d'ARNs totaux (RT), avec différents couples d'amorces. (a) présente les courbes de fusion pour le gène d'intérêt UBC avec les échantillons. (b) présente les courbes de fusion pour le pré-miARN319a1.1 et (c) le pré-miARN319a1.1. Toutes les amorces ont été diluées à 1/10^{ème} tandis que les ADNc ont été diluées au 1/25^{ème}.

Tableau I : Récapitulatif des primaires et précurseurs des miARNs étudiés.

Nom du miARN étudié	Numéro d'accession du gène codant le pré-miARN sur le génome de <i>Rosa chinensis</i> dont provient le miARN	Nom donné au précurseur et primaire du miARN
miR319a1	RC7G0175600	miR319a1.1
	RC5G0635700	miR319a1.2

3.2.3. Test qPCR

Les courbes de dénaturation (=melting curves) obtenues lors de la qPCR pour l'UBC sont homogènes puisque présentent un pic unique (Figure 13 (a), (b) et (c)). Leur température de dénaturation (=melting temperature) est d'environ 82°C pour l'UBC et le pré-miARN319a1.2.

Cette analyse est utilisée pour évaluer la spécificité du test qPCR, lors. Un test spécifique, comme c'est le cas ici, doit montrer un seul pic de fusion correspondant à un produit PCR spécifique. Les résultats démontrent qu'un seul amplicon est produit et que les amorces sont spécifiques puisque ne produisent pas de structures secondaires.

En revanche, les amorces utilisées pour le suivi d'expression des primaires de ces *RhmiARNs* ne sont pas spécifiques car l'efficacité est mauvaise. Pour cette raison, l'étude des *RhprimiARNs* n'est pas présentée dans ce rapport. De nouvelles amorces vont être dessinées.

3.3. Profil d'expression des pré-miR319s

L'analyse du profil d'expression des précurseurs des miARN319a (pré-miARN319a1.1 et pré-miARN319a1.2) dans les bourgeons axillaires de rosier (Tableau I) a été réalisée. Dans cette étude, la condition t0 a été ciblée comme référence en vue d'identifier les différences d'expression relatives entre les différentes conditions étudiées. L'expression des précurseurs a été visualisée selon une cinétique de 0 à 96h après décapitation en condition lumière et obscurité.

***Rh*pré-miR319a1.1 :**

Dans le cas du précurseur, le *RhmiR319a1.1* a des valeurs d'expressions relatives globalement faible quel que soit la condition (Figure 14 (a)), étant donné que la valeur maximale est de 1.7 à t6 en condition obscurité. Ainsi, il est possible d'observer une induction de l'expression du pré-miARN319a1.1 6h après décapitation sous obscurité. De plus, il est possible de noter un différentiel entre l'obscurité et la lumière, puisque l'expression relative est 2 fois moins grande. De plus, les valeurs d'expression relative entre les deux conditions de lumière paraissent beaucoup plus rapprochées dans le cas de t24 et t96, ce qui pourrait montrer une réduction d'expression du pré-miARN319a1.1 à partir de 6h après décapitation.

***Rh*pré-miR319a1.2 :**

Concernant le *Rh*pré-miARN319a1.2, il est possible d'observer une différence d'expression relative importante entre les conditions lumière et obscurité aux points de cinétiques t6 et t96 (Figure 14 (b)). Dans les deux cas, l'expression relative est plus importante sous condition obscurité que lumière. Ainsi, à t6 l'expression relative sous obscurité est 1.5 fois plus grande que sous lumière, et est 3.5 fois plus grande sous obscurité que sous lumière à t96. Cependant, les expressions relatives à t24 sont plus faibles que le t0, que ce soit en lumière ou obscurité (0.9 et 0.7). Dans ce cas-ci, le pré-miARN319a1.2 est plus faiblement exprimé à la lumière à tout temps après décapitation par rapport à t0.

Pré-miARN319a1.1

Pré-miARN319a1.2

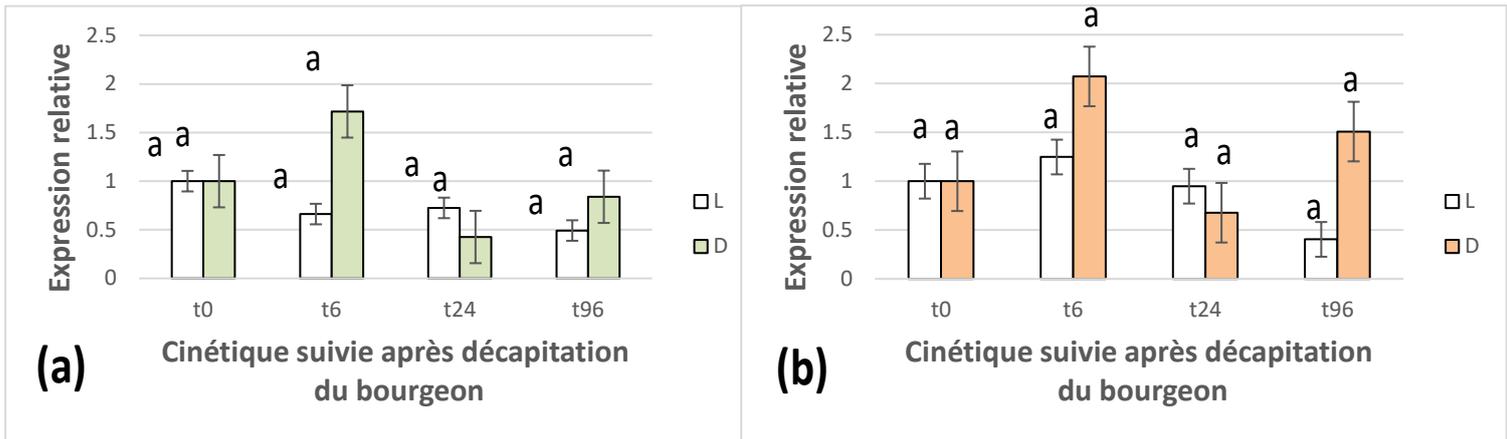


Figure 14 : Variation de l'expression du pré-miARN319a1.1. a) et du pré-miARN319a1.2 (b) au cours du processus de débourrement (de 0 à 96 h après décapitation). Evolution de l'expression de ces miARNs en condition lumière (barre blanche (L)) ou obscurité (barre colorée (D)). Les données issues de trois répétitions biologiques indépendantes représentent les expressions relatives moyennes des transcrits \pm l'erreur standard en référence à la condition. (Test de Student, p -value $\leq 0,05$).

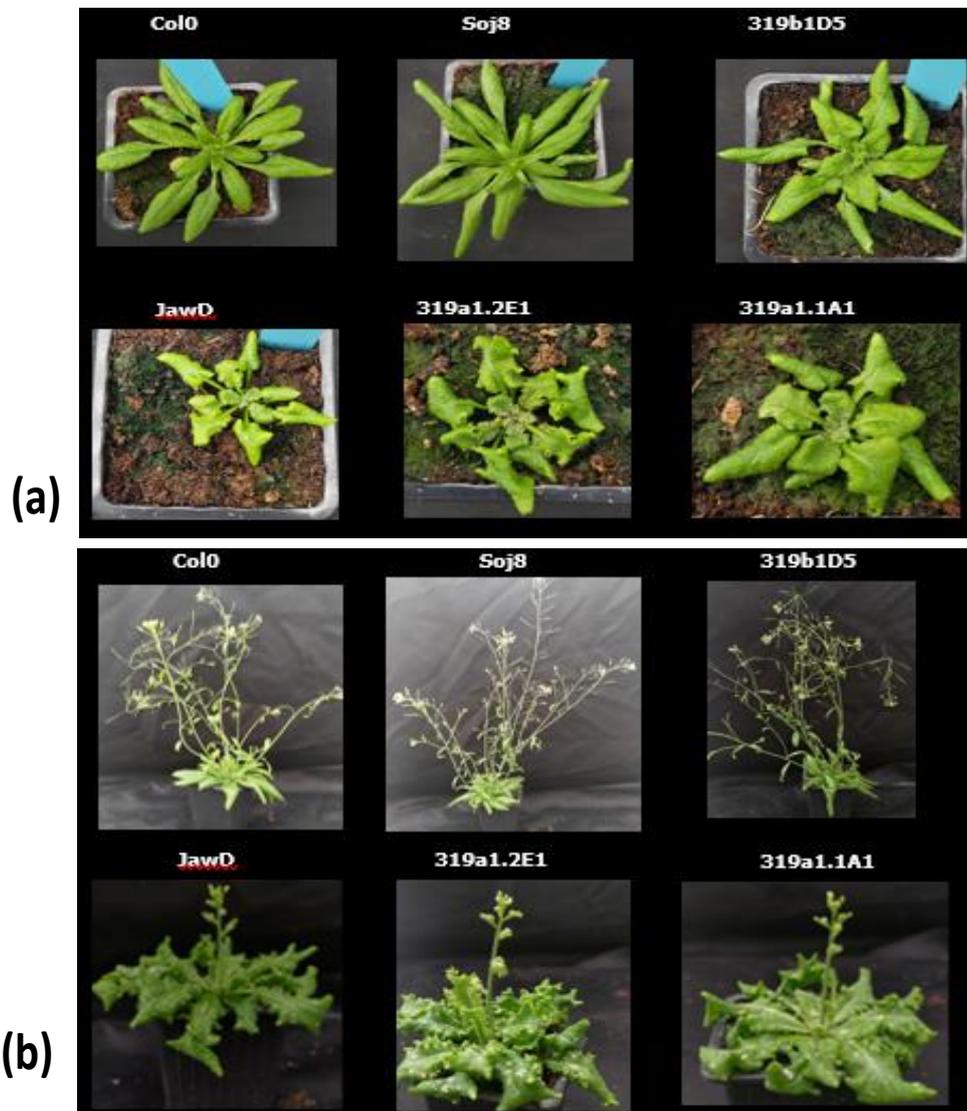


Figure 15 : Phénotype de lignées transgéniques d'*Arabidopsis thaliana* au stade végétatif (feuilles de rosette (a)) (Photo : MG le 9 juin 2023) et au stade reproducteur (b) (Photo : MG le 22 juin 2023)

Il serait donc inhibé par la lumière, d'autant plus en fin de cinétique de débourrement. On peut donc remarquer une possible influence de la lumière sur l'expression relative selon différents temps après décapitation.

Nous pouvons remarquer au bilan que les niveaux d'expressions relatives du *Rhpré-miARN319a1.2* sont légèrement plus élevées que celles du *Rhpré-miARN319a1.1*. En effet, à t6 le pré-miARN319a1.1 (Figure 14 (a)) possède une expression relative 1.2 fois plus faible que celle du pré-miARN319a1.2 (Figure 14 (b)) à l'obscurité. De même à la lumière, le *Rhpré-mi319a1.1* possède une expression relative 2.1 fois plus que le *Rhpré-mi319a1.2*. Ainsi, le *Rhpré-miARN319a1.2* pourrait être possiblement plus exprimé que *Rhpré-mi319a1.1*.

3.4. Phénotypage des lignées transgéniques d'*Arabidopsis thaliana*

L'ensemble des lignées transgéniques ont été obtenues et génotypées dans le cadre de la thèse de Julie Mallet (2018-2022) afin de valider la surexpression des précurseurs de rosier chez ces plantes. Le but de cette étude est d'évaluer l'impact de la surexpression sur le développement de ces plantes en nous concentrant sur la date de montaison et la ramification.

Des premières analyses de phénotypage ont été réalisées en serre. Un suivi en chambre de culture en conditions contrôlées étaient nécessaires afin de valider les différences de comportement sur les paramètres mesurés. Les mesures ont donc été effectuées tous les jours.

Des photographies des plantes représentatives de chaque lignée transgénique ont été prises 31 jours après semis (Figure 15 (a)). L'observation des lignées ox319a1.1A1 et ox319a1.2E1 montre qu'elles représentent un phénotype de développement foliaire similaire à la lignée *jaw-D*, surexprimant le pré-miARN319a d'*Arabidopsis*. De la même manière que *jaw-D*, ces plantes possèdent des feuilles dentelées et repliées, et se caractérisent par un retard de la montaison (Figure 15 (b)). L'axe principale ayant émergé, il est possible d'observer une certaine similitude entre deux plantes, en terme de développement que ce soit au stade végétatif et reproducteur : *soj8* et Col0 (Figure 15 (b)). Toutefois, *soj8* possède des pétioles plus allongés. A contrario, la lignée ox319b1D5 possède des feuilles moins allongées que *soj8* et Col0 (Figure 15 (a)).

Une analyse phénotypique plus poussée a été menée afin de déterminer les éventuels effets sur la ramification. Col0, la plante sauvage d'*Arabidopsis thaliana*, est la plante de référence.

La date de la première montaison pour chaque lignée a été suivie (Figure 16). On considère que l'émergence de l'inflorescence survient une fois que la hampe florale a atteint 0.5cm au-dessus des feuilles de rosette.

Il est donc possible de visualiser des différences concernant l'induction du stade reproducteur pour chaque lignée. Ainsi, la hampe florale de Col0 et *soj8* est visible dès le 27^{ème} jour après semis. Celle de la lignée ox319b1D5 est visible 28 jours après semis. Cependant, celle des lignées ox319a1.1A1 et ox319a1.2E1 n'est visible que le 34^{ème} et 35^{ème} jour respectivement. Encore plus tardive, la date de montaison de *jaw-D* n'arrive que le 38^{ème} jour après le semis.

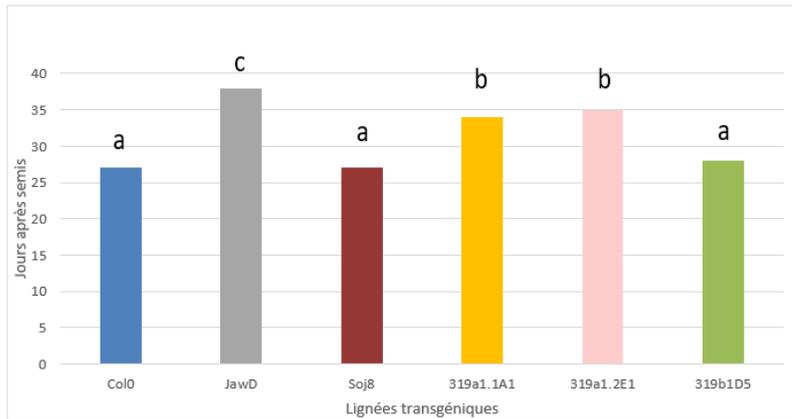


Figure 16 : Date de montaison (émergence de l'axe principal à 0.5cm) en jours après semis. Les lettres représentent la significativité de la lignée par rapport à Col0 (test de Kruskal et pairwise Wilcox, $P < 0.05$)

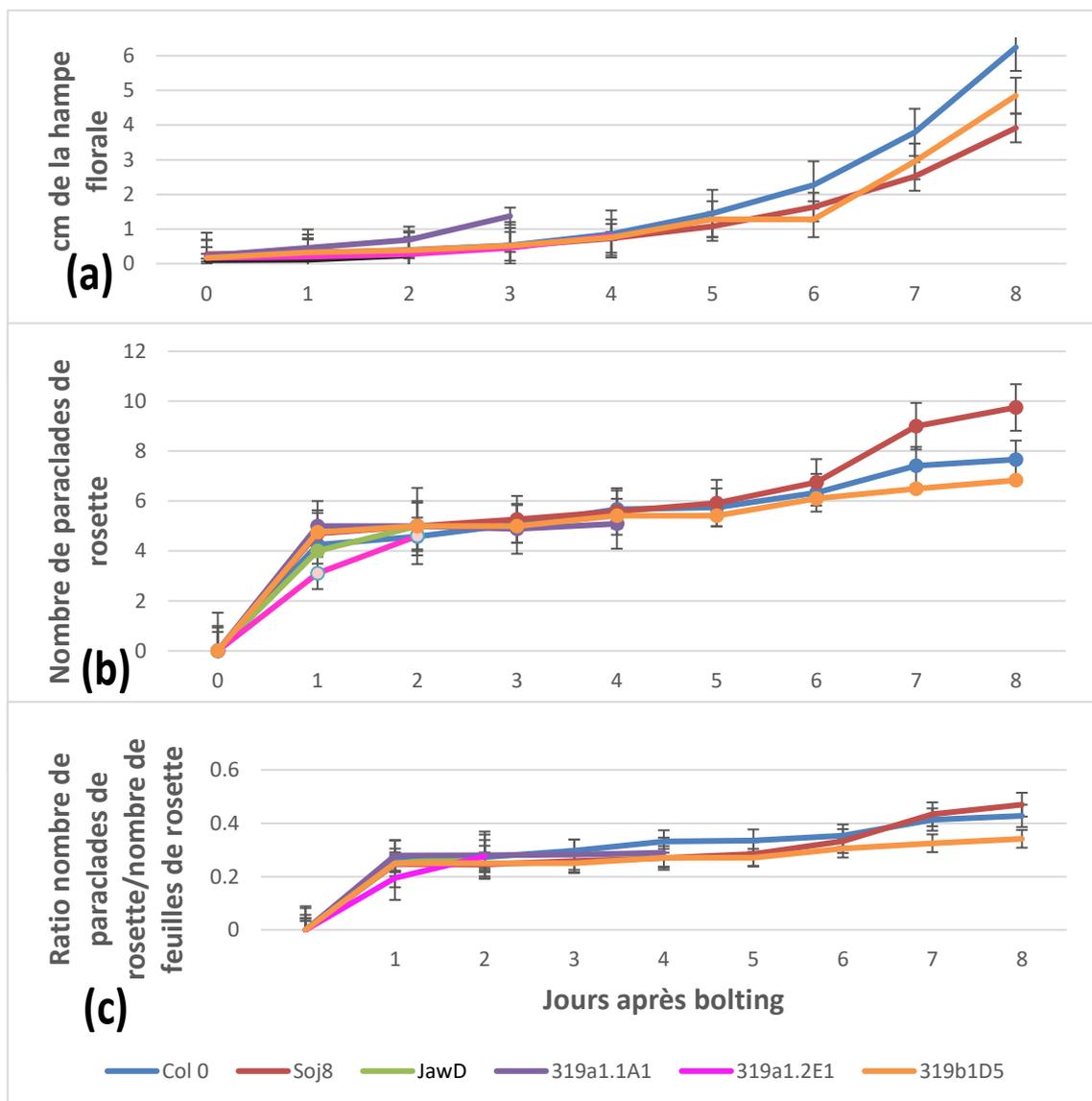


Figure 17 : Cinétique des différentes lignées transgéniques surexprimant les *RhmiARN319* de Rosa 'Radrazz' et d'*Arabidopsis* (*jaw-D*) et d'un mutant gène cible résistant au mir319 chez *Arabidopsis* (*soj8*). (a) : Suivi de la montaison en jours après semis. (b) : Cinétique d'émergence des paraclades/ramifications de rosette primaires en jours après bolting. Ratio selon la cinétique d'émergence des paraclades de rosette/ Nombre de feuilles de rosette en jours après bolting (PR/FR). Les barres d'erreurs représentent les erreurs standards.

Le nombre des feuilles ayant été comptabilisé, il est possible d'affirmer que ce retard ne peut pas être attribué à un développement végétatif plus important puisque ces lignées possèdent un nombre de feuilles de rosette moins important que la lignée sauvage. En effet, Col0 possède 18 feuilles de rosette en moyenne lors de sa phase d'émergence de l'axe principal, tandis que les lignées ox319a1.1A1 et ox319a1.2E1 en possèdent 17 en moyenne.

Ces résultats suggèrent que la surexpression du miARN319a de rosier spécifique chez Arabidopsis peut entraîner un retard de floraison, tout comme un retard de développement des feuilles de rosette, et donc un ralentissement du stade végétatif.

Par la suite, un suivi de la croissance de la hampe en jours après bolting a été effectué (Figure 17 (a)). Col0 est encore une fois utilisé comme référence. Du 27^{ème} au 32^{ème} jours après semis, la hampe florale de Col0, *soj8* et ox319b1D5 se développe de façon identique en termes de longueur. Du 32^{ème} au 38^{ème} jours après semis, la hampe de Col0 augmente de 17.3cm tandis qu'elle augmente de 13.3cm et 11.1cm pour les lignées 319b1D5 et *soj8*, respectivement. Cependant, la hampe florale des lignées ox319a1.1A1 et ox319a1.2E1 ne se développe qu'à partir du 34^{ème} jour.

La lignée ox319a1.1A1 paraît mieux se développer que la lignée ox319a1.2E1 en terme de vitesse puisque la hampe croît bien plus rapidement. En revanche, *jaw-D* présente un retard dans l'établissement de son stade reproducteur puisque sa hampe florale ne se développe qu'à partir du 36^{ème} jour.

Un autre paramètre mesuré pour le phénotypage a été le nombre de feuilles de rosette et de feuilles caulines. Le nombre de feuilles de rosette atteint un plateau dès que la plante passe du stade végétatif au stade reproducteur.

Ces données ont permis d'effectuer un ratio, concernant la cinétique d'émergence de ramification de paraclades de rosette, c'est-à-dire des ramifications primaires autour des feuilles de rosette, par rapport au nombre de feuilles de rosette (Figure 17 (c)).

Le nombre de paraclades de rosette ne varie pas entre les lignées Col0, *soj8* et ox319b1D5 de 0 à 4 jours. Les notations pour les lignées ox319.1.1A1, ox319.1.2E1 et *jaw-D* s'arrêtent 4 jours après l'émergence de l'inflorescence puisque celle-ci est récente, contrairement aux autres lignées. La date d'apparition de la hampe florale ayant été plus tôt, il est possible de comparer le nombre de paraclades de rosette de Col0, *soj8* et de ox319b1D5. Ainsi, *soj8* possède plus de paraclades de rosette que le WT Col0 (10 et 8 paraclades, respectivement), tandis que le mutant 319b1D5 en possède moins (7 paraclades), à un même point de cinétique : à 8 jours après l'apparition de la hampe florale.

Une analyse du ratio du nombre de paraclades de rosette sur nombre de feuilles de rosette a été calculé (PR/FR), et a pu montrer que le ratio de *soj8* est plus grand que celui de Col 0 (0.47 et 0.43, respectivement) au 8^{ème} jour après bolting (Figure 17 (c)). Ainsi, *soj8* produit plus de ramifications de rosette selon son nombre de feuilles de rosette que Col0, soit une augmentation de 4%. Dans le cas des autres mutants, il serait intéressant de voir l'évolution de ce ratio au même stade de développement, c'est-à-dire 8 jours après le bolting.

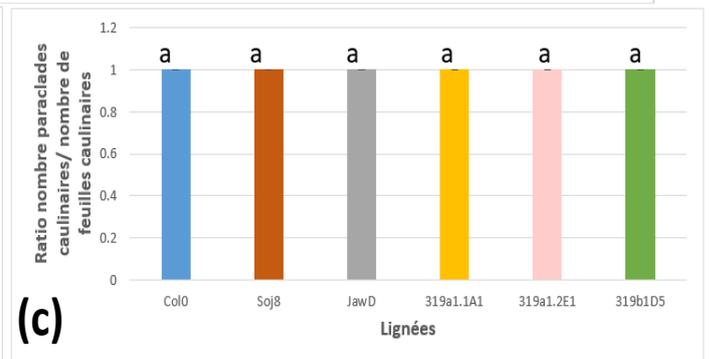
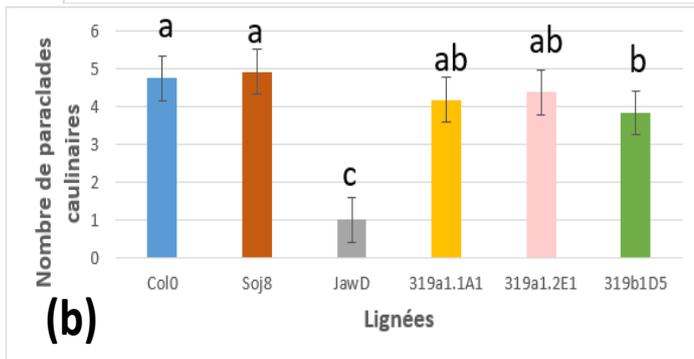
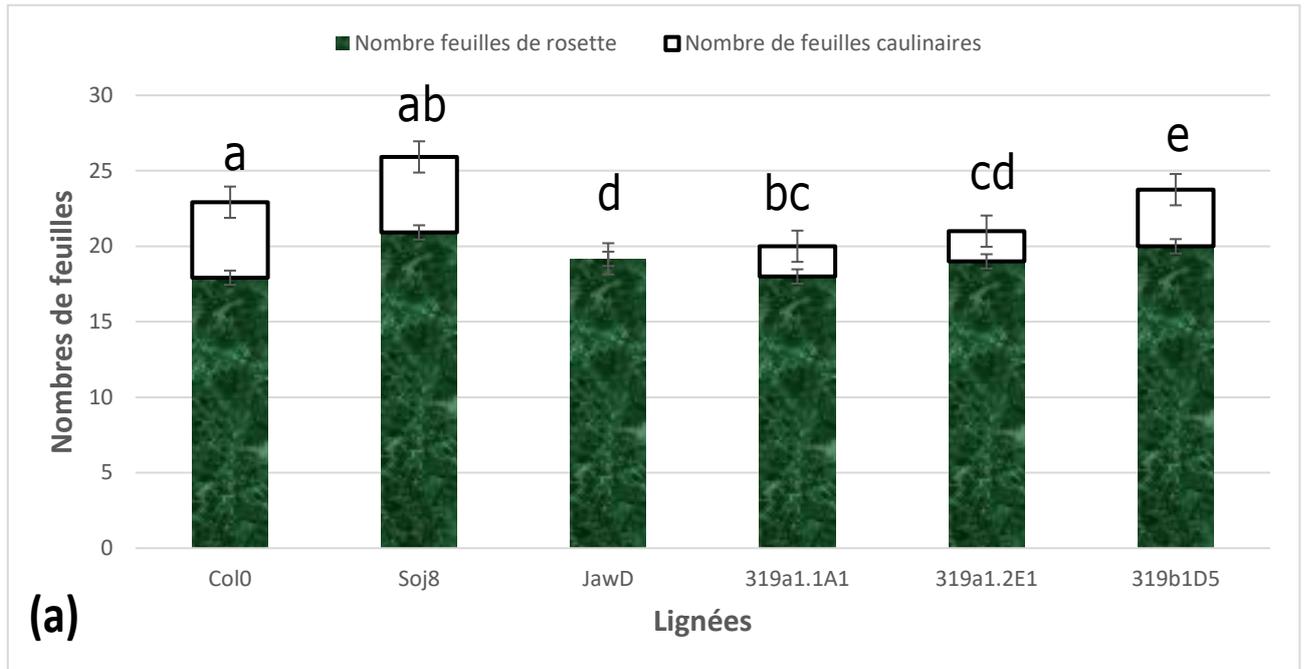


Figure 18 : Phénotype des différentes lignées transgéniques surexprimant les *RhmiARN319* de Rosa 'Radrazz' et d'*Arabidopsis* (*jaw-D*) et d'un mutant gène cible résistant au mir319 chez *Arabidopsis* (*soj8*). (a) Nombre de feuilles caulinaires et de rosette 38 jours après le semis (LSD.test, $P < 0.05$). (b) Nombre de paraclades caulinaires 42 jours après le semis. (c) Ratio du nombre de paraclades caulinaires/ nombre de feuilles caulinaires (PC/FC) (test de Kruskal et pairwise Wilcox, $P < 0.05$). Les lettres représentent le phénotype significatif de la lignée par rapport à la lignée sauvage Col0.

Il est tout de même possible d'apercevoir que la lignée ox319a1.2E1 possède un ratio PR/FR plus faible que les autres lignées, suggérant un retard dans la ramification primaire. De plus, le mutant ox319a1.1A1 semble avoir un ratio stagnant de 0.3 de 0 à 4 jours après bolting.

Une comparaison du nombre de feuilles de rosette et caulinaires entre chaque lignée à un temps donné a été effectuée (Figure 18 (a)). Concernant *soj8*, on peut remarquer que le nombre de feuilles caulinaires est identique à celui de Col0 (5 au total 38 jours après semis), par contre cette lignée produit 21 feuilles de rosette en moyenne, tandis que Col0 n'en possède que 18 en moyenne. La lignée ox319a1.2E1 quant à elle, possède légèrement plus de feuilles de rosette et de feuilles caulinaires que la lignée ox319a1.1A1.

Cependant, cette lignée possède plus de feuilles de rosette que Col0, mais moins de feuilles caulinaires. Cela pourrait probablement s'expliquer par le fait que la lignée ox319a1.2E1 ait eu un retard de ramification lorsqu'on le compare à Col0. La lignée ox319b1D5 va posséder plus de feuilles caulinaires (4 au total à 38 jours après semis) que les lignées ox319a1.1A1 et ox319a1.2E1 (2 pour chaque lignées 38 jours après semis), et plus de feuilles de rosette puisqu'en possède 20 tandis que les autres lignées 18 et 19 respectivement. Le stade reproducteur s'étant révélé plus tôt pour ox319b1D5, cela pourrait expliquer ces différences.

De plus, il est possible de remarquer que *jaw-D* n'a toujours pas de ramification caulinaire 38 jours après le semis. En effet, comme vu à la Figure 17, à ce stade, *jaw-D* commence juste sa transition vers le stade reproducteur, il est donc normal d'apercevoir un retard de la ramification secondaire, et donc de l'apparition des feuilles caulinaires.

En outre, le nombre de paraclades caulinaires se développant sur l'axe inflorescentiel principal a été dénombré. Le dénombrement a été effectué 4 jours après celui des feuilles caulinaires et de rosettes (Figure 18 (b)), afin d'observer d'éventuelles paraclades caulinaires chez *jaw-D*.

Les lignées ox319a1.1A1, ox319a1.2E1 et ox319b1D5 présentent un nombre de paraclades caulinaires réduit (4.18, 4.37 et 3.83 en moyenne respectivement) par rapport à la lignée sauvage Col0 (4.75 paraclades caulinaires en moyenne) (Figure 18 (b)). Le mutant *soj8* n'est significativement pas différent du WT contrairement aux autres lignées. Les mutants *Rh319a1.1A1* et *Rh319a1.2E1* ont, de manière significative, le même nombre de feuilles caulinaires, contrairement à *jaw-D* qui n'en possédait qu'une au temps de mesure.

Toutefois, il est à noter que le ratio nombre de paraclades caulinaires/nombre de feuilles caulinaires (ration PC/FC) est égal à 1 chez toutes les lignées (Figure 18 (c)). Ainsi, il n'y a pas d'effet de la surexpression des *RhmiARN319a* et du *RhmiARN319b1D5* sur la différenciation des bourgeons à l'échelle des feuilles caulinaires de l'inflorescence ni sur leur capacité à produire un axe inflorescentiel secondaire.

4. Discussion

Comme mentionnée en introduction, beaucoup de connaissances ont été apportées par l'équipe STRAGENE de l'IRHS dans l'étude des régulations transcriptionnelles impliquées dans le photo-contrôle du débourrement chez le rosier (Girault, 2009; Barbier *et al.*, 2015). En particulier, certains gènes seraient différenciellement exprimés et photo-régulés dès 6h après la décapitation du bourgeon, comme le gène NAD-SDH (NAD-DEPENDANT SORBITOL DEHYDROGENASE) qui serait induit à la lumière mais réprimé à l'obscurité (Roman *et al.*, 2016).

Comme il a pu être vu, certains miARNs ont un rôle dans le développement des bourgeons axillaires chez d'autres espèces, tels que le riz et le maïs (Lan and Qin, 2020). Toutefois, il existe peu d'études sur le lien qu'existerait entre les miARNs, le débourrement et la lumière. Il semble donc important d'approfondir les études concernant le rôle de miARNs dans le contrôle du débourrement.

4.1. Etude du profil d'expression des pré-miR319s

Cette partie avait pour but d'étudier l'évolution de l'expression relative, obtenue lors de la qPCR, des deux précurseurs *AthmiR319a1.1* et *AthmiR319a1.2* afin de visualiser ou non des différentiels d'expression. Les résultats concernant les précurseurs ont été principalement analysés en raison d'études menées sur le microARN319 mature dans le cadre de la thèse de J.Mallet. Effectivement, ce miARN mature présente un différentiel d'expression à la lumière et à l'obscurité. Cette étude a donc eu pour but d'approfondir les connaissances sur ce miARN en allant en amont de la voie de biogenèse des miARNs matures, et de consolider les résultats obtenus lors de la thèse de Julie Mallet.

D'un aspect visuel, il nous a paru évident que le *Rhpré-miARN319a1.1* s'exprimait différenciellement à l'obscurité 6 heures après décapitation tout comme le *Rhpré-miARN319a1.2* à l'obscurité 96 heures après décapitation (Figure 14). Bien que les cinétiques suivies après décapitation du bourgeon pour les deux précurseurs paraissent significatives, les tests statistiques ont prouvé le contraire. Les tests de Student effectués ne permettent pas de mettre en évidence de différences statistiques significatives entre les deux conditions de lumière au sein d'un même temps de cinétique de décapitation de bourgeon, ni entre les temps cinétiques.

Le résultat trouvé par Julie Mallet, notamment sur le fait que le *RhmiARN319a1* soit induit à l'obscurité 6 heures après décapitation, est en adéquation avec les résultats trouvés dans cette étude. Bien que les tests statistiques n'ont rien prouvé de significatif, la tendance est présente.

Il serait intéressant d'étudier les primaires de ces miARNs, afin d'observer de potentielles différences d'expression entre ceux-ci et leurs précurseurs.

4.2. Etude du phénotype des lignées transgéniques *Arabidopsis*

Nous avons dans cette partie étudié le phénotype de lignées d'*Arabidopsis* oxmiARN319a1 et les lignées oxmiARN319b1D5 surexprimant les précurseurs des miARN319a1 et miARN319b1D5.

Comme il a pu être observé en Figure 8, les lignées ox319a1.1A1 et ox319a1.2E1 ont un phénotype de développement foliaire similaire à celui de *jaw-D*, surexprimant le miARN319a d'*Arabidopsis*. En effet, ces lignées ont pratiquement un même temps de stade végétatif et de montaison. De plus, elles possèdent un même nombre en moyenne de paraclades et de feuilles de rosette.

Il a été noté que leur période végétative est bien plus longue que la plante sauvage, Col0. La surexpression de ces miARNs pourraient donc avoir un effet répresseur sur l'initiation des feuilles de rosette, et retardateur du stade reproducteur. Malgré tout nous pouvons noter que ces lignées mutantes possèdent bien plus de paraclades et de feuilles caulinaires que *jaw-D* (Figure 18) de manière significative. Comme a pu l'observer Julie Mallet lors de sa thèse, ces mutants possèdent une accumulation de transcrits bien plus fort que *jaw-D*. Il est donc fort probable que cette accumulation de transcrits dans les lignées mutantes ait un lien avec leur développement foliaire, puisque possèdent plus de feuilles caulinaires et de rosette que *jaw-D*.

Bien que nous ayons peu de résultats informatifs concernant les lignées ox319a1.2E1, ox319a1.1A1 et *jaw-D* compte tenu du retard de l'émergence de la hampe florale, il est tout de même possible de remarquer une différence dans la cinétique d'émergence des ramifications de rosettes (Figure 18(b)). Ainsi, ces lignées possèdent moins de paraclades de rosette, signe de retard non pas seulement du stade végétatif mais aussi reproducteur.

Par contre, nous avons aperçu que les lignées mutantes *Rhmir319a1.1A1*, *Rhmir319a1.2E1* et *jaw-D* possédaient moins de feuilles de rosette et de paraclades caulinaires, contrairement à *soj8* et *Rhmir319b1D5* qui en possédaient bien plus que Col0 (Figure 18(a)). Etant donné qu'aucune diminution ou accumulation significative du ratio PC/FC n'a été observée, la surexpression de ces miARNs du rosier chez *Arabidopsis thaliana* ne semble pas avoir d'effet sur la différenciation des bourgeons au niveau des feuilles caulinaires de l'inflorescence, ni sur leur capacité à produire un axe inflorescentiel secondaire. Ainsi, les méristèmes axillaires caulinaires se développeraient différemment des méristèmes axillaires de rosette, puisque sembleraient soumis à une phase de dormance avant de se développer (Nicolas *et al.*, 2022)

A propos du nombre de paraclades de rosette, il est possible d'affirmer que certaines lignées telles que *soj8*, ox319a1.1A1 et ox319b1D5 présentent un développement des ramifications plus précoce que Col0 (Figure 18 (b)). En effet, 1 jour après le bolting, ces 3 lignées transgéniques possèdent plus de paraclades de rosette que le WT, signe de prématurité. Toutefois, seul le mutant *soj8* en possédera plus que Col0 au cours du temps. Cela peut aussi s'exprimer par le ratio PR/FR qui confirme clairement que cette lignée est précoce en termes de ramification de rosette.

Concernant le mutant *soj8*, il a été noté qu'il présentait un phénotype se distinguant de celui de Col0, en particulier lorsque l'on compare leur nombre de feuilles de rosette et caulinaires (Figure 18 (a)) et le nombre de paraclades de rosette (Figure 17 (b)). En effet, la lignée présente significativement un nombre plus élevé dans les deux cas par rapport à la lignée sauvage.

De ce fait, il est possible d'envisager que la rapidité du développement du stade végétatif et reproducteur soit proportionnelle à la rapidité à laquelle le bourgeon va atteindre le stade du débourrement. En effet, même si le nombre de ramifications de rosette est en général de 5 lorsque le stade reproducteur commence, celui-ci augmente drastiquement une fois que la bolt principale se développe (Figure 17 (b), (c)) que ce soit en termes de paraclades de rosette ou bien caulinaires (Figure 18 (b)).

De cette manière, les résultats phénotypiques obtenues sont légèrement différents de ceux obtenus par Julie Mallet lors de sa thèse. En effet, les conditions n'étaient pas les mêmes puisque ces plantes ont été sous serre tandis que celles-ci étaient en chambre de culture, et donc en conditions contrôlées.

Il serait intéressant de savoir quel gène spécifique est ciblé par chacun de ces miARNs pour mieux comprendre les différents schémas de signalisation face aux conditions de lumière, tels que les TCPs existants chez le rosier : TCP2 et TCP4. De plus, *Arabidopsis thaliana* possède en plus des gènes du rosier les gènes TCP3, TCP10 et TCP24. Ainsi, les analyses pourraient être effectuées sur les deux plantes afin de comparer les niveaux d'expression de ces gènes marqueurs.

4.3. Difficultés rencontrées

4.3.1. Designer les amorces

Avant toutes manipulations en laboratoire, des analyses bio-informatiques ont été nécessaires afin de commander des amorces pouvant s'hybrider parfaitement et spécifiquement aux précurseurs et gène codant le miARN319 voulu. L'une des difficultés a été de trouver de fortes similarités de séquences ne s'hybridant pas avec l'ensemble ou une partie des autres membres de la famille du miARN d'intérêt. De plus, beaucoup de conditions doivent être prises en considération telles que le %GC devant être en moyenne de 50% ou bien la température d'hybridation qui ne doit pas excéder les 5°C de différence entre les deux amorces d'un couple. Par ailleurs, les amorces doivent être de 20 pb en moyenne, ce qui peut s'avérer délicat vu les conditions imposées pour obtenir un bon couple d'amorces.

Trouver des amorces spécifiques a donc été une tâche difficile, d'autant plus qu'une erreur dans le choix des amorces ne sera observée qu'au moment du test d'efficacité du couple d'amorces lors d'une qPCR.

4.3.2. Résultats de qPCR non significatifs

Chez le rosier, le débourrement étant sous l'influence de la lumière, un impact sur le débourrement des bourgeons selon différentes conditions de lumière était en principe ce que l'on s'attendait à voir. Or, aucun des résultats obtenus ne diffère significativement entre les conditions de lumière et les différents points de cinétique après décapitation des bourgeons de rosier. Il serait tout de même intéressant de se focaliser sur certaines conditions, qui montrent clairement un contraste entre la condition à la lumière et à l'obscurité, à t96 pour le miARN319a1.2.

Il serait possible que le couple d'amorces choisis ne soit pas le plus efficace, et qu'il en existe un plus robuste, permettant de démontrer que ce miARN est différentiellement exprimé. Comme il a été possible de le voir, le couple d'amorces du pri-miARN319a1.2 n'est pas efficace (Figure 15(d)). En effet, les courbes de melting curves montraient des points de fusion à 74°C et 83°C, comme si ces amorces détectaient le primaire et le précurseur du miARN. Ainsi, les comparaisons statistiques entre le pri et le pré-miARN319a1.2 sont faussées.

De manière plus générale, les tests statistiques ne sont peut-être pas significatifs en raison des valeurs de Cq. Effectivement, les expressions relatives sont calculées à partir des valeurs de Cq du gène de référence (UBC) et d'intérêt (pri et pré-miARN). Les trois réplicats techniques d'un lot permettent de cumuler 3 Cq, mais doivent être proches (± 1 valeur). S'il y a beaucoup de différences entre les Cq de réplicats techniques, cela peut influencer la robustesse des tests statistiques.

4.3.3. Culture des plantes transgéniques d'*Arabidopsis thaliana*

Le phénotypage présenté dans ce rapport de mémoire, a été réalisé en partie, des mesures sont encore en cours pour les lignées les plus tardives dans leur développement. En effet, des prélèvements de cœur de rosette ont pu être réalisés selon un temps de développement distinct pour chaque lignée. Il a donc fallu être présent chaque jour pour effectuer les potentiels prélèvements. Bien que les prélèvements aient été effectués, il n'a pas été possible de faire les analyses et les présenter dans ce rapport.

Une autre complication a été le peu de plants d'*Arabidopsis thaliana* pour cette expérience. En effet, il y avait 2 plantes par lots, et 2 lots ou plus par condition (t0 et t2) afin d'avoir des répétitions biologiques. Ainsi, en raison du peu de conditions dans cette étude, il serait intéressant de produire d'autres lots ultérieurement afin de procéder à des tests statistiques une fois les résultats obtenus.

5. Conclusions et perspectives

5.1. Conclusions

Les expressions du niveau de transcrits primaires et précurseurs des *RhmiARN319a1.1* et *RhmiARN319a1.2* ont été mesurées par qPCR. Bien que l'expérience ait été reproduite à deux reprises, les tests statistiques ne permettent pas de mettre en évidence des différences significatives entre les deux conditions de traitement lumière et obscurité sur un même point de cinétique, ni entre les points de cinétiques sur une même condition de traitement. Cependant, le précurseur du *RhmiARN319a1.2* paraît être différentiellement exprimé à t96, étant donné que l'expression relative est de 1.5 sous obscurité, soit 3.5 fois plus qu'en présence de lumière. Cela vient confirmer les résultats obtenus par J.Mallet lors de sa thèse sur l'expression du mature. De plus, le lien entre l'expression du gène cible TCP et l'expression du *RhmiR319a1.2* mature a été testé et révélé, confirmant ainsi un lien entre ce gène et le débourrement.

Le phénotypage quant à lui a permis d'affirmer que certains miARNs de la famille des *RhmiARN319* avaient un lien avec le débourrement, et plus particulièrement sur la vitesse de ramification.

Le gène *TCP4* du mutant *soj8*, est résistant au miARN319. Cela est bien visible sur les graphiques (Figure 18 (a)) présentant le nombre de feuilles de rosette et caulines. En effet, *soj8* possède en général plus de feuilles que Col0, et donc présente une prolongation de la phase végétative adulte, puisque l'action du miARN319 est amoindrie. De plus, *soj8* présente un développement des ramifications de rosette plus précoce que Col0 (Figure 18 (b)), signe de prématurité. Ainsi, ce mutant se distingue de Col0 de manière phénotypique puisque présente significativement un nombre plus élevé de feuilles caulines et de rosettes, tout comme de ramifications de rosette par rapport à la lignée sauvage. A l'inverse, la surexpression de miR319b1D5 entraîne une plus courte période végétative et une transition florale plus précoce.

Bien que des données complémentaires soient nécessaires, telles que des expériences sur les gènes cibles de ces miARNs d'intérêts, l'implication des miARN319s a et b dans le débourrement semble se confirmer. L'affinement du travail de recherche des points de cinétique, notamment 96 heures après décapitation sous obscurité dans le cas du *Rhpré-miARN319a1.2*, et des conditions environnementales, notamment celles en chambre de culture, permettra d'obtenir des résultats bien plus précis et fiables que ceux recueillis au cours de ce stage.

Il serait intéressant d'approfondir les recherches afin d'affiner les schémas d'implication des différents facteurs environnementaux (stress froid, thermique) et endogènes (métabolisme des sucres, ROS) de la plante dans les voies de signalisation médiant le débourrement.

5.2. Perspectives

La recherche des miARNs impliqués dans le débourrement de bourgeon chez le rosier semble importante puisqu'elle permettra d'identifier les acteurs de cette phase essentielle du développement ayant une influence sur l'architecture des plantes. L'étude exclusive de l'expression de la famille du miARN319 a été sélectionnée suite au smallRNAseq, et paraît être une bonne piste de travail.

En effet, chez *Arabidopsis thaliana*, le gène *TCP4* active la transcription du gène *YUCCA5*, gène de synthèse de l'auxine (Lan and Qin, 2020). Il existerait ainsi un lien en amont de la signalisation entre les miARN, notamment de la classe miARN319, et *BRC1*, le gène permettant l'inhibition du débourrement des bourgeons. Cependant, 3 hypothèses sont possibles : 1- Le gène *TCP* est ciblé par la famille du miARN319 et agit en amont du gène *BRC1* sur le débourrement ; 2- Le gène *TCP* intervient en aval du gène *BRC1* sur le débourrement ; 3- Le gène *TCP* suit une voie indépendante du gène *BRC1*. C'est pourquoi il serait intéressant de croiser les lignées surexpresseurs mir319a1, produisant moins de ramifications, et le mutant *brc1*, produisant à l'inverse plus de ramification. Cela permettrait de vérifier la capacité de débourrement.

Une autre étude en perspective est la corrélation que pourrait avoir la signalisation des sucres et le débourrement. Effectivement, les sucres ne sont pas seulement des facteurs trophiques en étant source de carbone pour le métabolisme des plantes. Ils permettent de favoriser en grande partie la croissance des bourgeons chez de nombreuses espèces en agissant comme des signaux. Ainsi, les sucres peuvent affecter des processus de développement du bourgeon, en parti l'expression du gène *BRC1* (Wang et al. 2019).

Il a été découvert que la décapitation entraîne une augmentation des niveaux de tréhalose-6 phosphate (T6P) dans les bourgeons axillaires et une diminution du niveau d'expression du gène *BRC1*. Cela confirme que le T6P pourrait être le médiateur de la régulation du gène *BRC1*, en fonction des sucres (Henry et al., 2011).

Chez le rosier, l'implication de la signalisation du sucre, notamment le saccharose, en relation avec la glycolyse/le cycle (TCA) et le (OPPP) a été suggérée. Le couple mir319/TCP4 pourrait donc être impliqué aussi bien en réponse aux hormones qu'en réponse aux sucres.

La croissance des bourgeons axillaires s'ajuste selon la quantité de sucre et d'auxine, l'augmentation de la quantité du sucre entraînant une levée de l'inhibition de la croissance des bourgeons axillaires par l'auxine et l'effet du sucre implique la répression de la réponse des strigolactones (Bertheloot et al., 2020). Ces sujets d'études méritent toute l'attention puisque pourraient permettre une meilleure ramification et débourrement de bourgeons et ainsi contribuer à un meilleur rendement cultural, que ce soit pour le rosier, dont l'architecture est importante selon l'utilisation que nous en faisons, ou tout autre plante ornementale et culturale.

6. Bibliographie

- Aguilar-Martínez, J.A., Poza-Carrión, C. and Cubas, P. (2007) 'Arabidopsis BRANCHED1 acts as an integrator of branching signals within axillary buds', *The Plant Cell*, 19(2), pp. 458–472. doi:10.1105/tpc.106.048934.
- Barbier, F. et al. (2015) 'Sucrose is an early modulator of the key hormonal mechanisms controlling bud outgrowth in *Rosa hybrida*', *Journal of Experimental Botany*, 66(9), pp. 2569–2582. doi:10.1093/jxb/erv047.
- Bertheloot, J. et al. (2020) 'Sugar availability suppresses the auxin-induced strigolactone pathway to promote bud outgrowth', *New Phytologist*, 225(2), pp. 866–879. doi:10.1111/nph.16201.
- Brewer, P.B. et al. (2009) 'Strigolactone acts downstream of auxin to regulate bud outgrowth in pea and Arabidopsis', *Plant Physiology*, 150(1), pp. 482–493. doi:10.1104/pp.108.134783.
- Budak, H. and Akpinar, B.A. (2015) 'Plant miRNAs: biogenesis, organization and origins', *Functional & Integrative Genomics*, 15(5), pp. 523–531. doi:10.1007/s10142-015-0451-2.
- Cline, M.G. (1997) 'Concepts and terminology of apical dominance', *American Journal of Botany*, 84(8), pp. 1064–1069. doi:10.2307/2446149.
- Demotes-Mainard, S. et al. (2016) 'Plant responses to red and far-red lights, applications in horticulture', *Environmental and Experimental Botany*, 121, pp. 4–21. doi:10.1016/j.envexpbot.2015.05.010.
- Girault, T. (2009) *Etude du photocontrôle du débourrement du bourgeon chez le rosier (Rosa sp. L) : impact de la lumière sur le métabolisme glucidique et l'élongation cellulaire*. Available at: <https://theses.hal.science/tel-00960749> (Accessed: 11 June 2023).
- González-Grandío, E. et al. (2013) 'BRANCHED1 Promotes Axillary Bud Dormancy in Response to Shade in Arabidopsis', *The Plant Cell*, 25(3), pp. 834–850. doi:10.1105/tpc.112.108480.
- Hall, S.M. and Hillman, J.R. (1975) 'Correlative inhibition of lateral bud growth in *Phaseolus vulgaris* L. timing of bud growth following decapitation', *Planta*, 123(2), pp. 137–143. doi:10.1007/BF00383862.
- Lan, J. and Qin, G. (2020) 'The Regulation of CIN-like TCP Transcription Factors', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), p. 4498. Available at: doi:10.3390/ijms21124498.
- Lang, G.A. et al. (1987) 'Endo-, Para-, and Ecodormancy: Physiological Terminology and Classification for Dormancy Research', *HortScience*, 22(3), pp. 371–377. doi:10.21273/HORTSCI.22.3.371.
- Leduc, N. et al. (2014) 'Light Signaling in Bud Outgrowth and Branching in Plants', *Plants*, 3(2), pp. 223–250. doi:10.3390/plants3020223.
- Laghari, A.J., Laghari, U.A. and Laghari, A.H. (2016) 'CULTIVATION OF ROSE (*ROSA INDICA* L.)', *Journal of Floriculture and Landscaping* [Preprint]. doi:10.25081/jfcls.2016.v2.3044.
- Li, S. (2015a). The Arabidopsis thaliana TCP transcription factors : A broadening horizon beyond development. *Plant Signaling & Behavior*, 10(7), e1044192. doi: 10.1080/15592324.2015.1044192
- Mallet, J. et al. (2022) 'Photocontrol of Axillary Bud Outgrowth by MicroRNAs: Current State-of-the-Art and Novel Perspectives Gained From the Rosebush Model', *Frontiers in Plant Science*, 12, p. 770363. doi:/10.3389/fpls.2021.770363.
- Müller, D. and Leyser, O. (2011) 'Auxin, cytokinin and the control of shoot branching', *Annals of Botany*, 107(7), pp. 1203–1212. doi:10.1093/aob/mcr069.
- Nakamura, N. et al. (2018) 'Genome structure of *Rosa multiflora*, a wild ancestor of cultivated roses', *DNA Research*, 25(2), pp. 113–121. Available at: doi:10.1093/dnares/dsx042.

- Pagano, L. *et al.* (2021) 'miRNA regulation and stress adaptation in plants', *Environmental and Experimental Botany*, 184, p. 104369. doi:10.1016/j.envexpbot.2020.104369.
- Palatnik, J.F. *et al.* (2007) 'Sequence and Expression Differences Underlie Functional Specialization of Arabidopsis MicroRNAs miR159 and miR319', *Developmental Cell*, 13(1), pp. 115–125. doi:10.1016/j.devcel.2007.04.012.
- Roberts, T. *et al.* (2014) 'Detection and quantification of extracellular microRNAs in murine biofluids', *Biological procedures online*, 16, p. 5. doi:10.1186/1480-9222-16-5.
- Roman, H. *et al.* (2016) 'Cytokinins Are Initial Targets of Light in the Control of Bud Outgrowth1[OPEN]', *Plant Physiology*, 172(1), pp. 489–509. doi:10.1104/pp.16.00530.
- Suarez, I.P. *et al.* (2015) 'Induced folding in RNA recognition by Arabidopsis thaliana DCL1', *Nucleic Acids Research*, 43(13), pp. 6607–6619. doi:10.1093/nar/gkv627.
- Thimann, K.V. (1939) 'Auxins and the Inhibition of Plant Growth', *Biological Reviews*, 14(3), pp. 314–337. doi:10.1111/j.1469-185X.1939.tb00937.x.
- Vroland, C. (2016) *Algorithmique pour la recherche de motifs approchée et application à la recherche de cibles de microARN*. Available at: <https://theses.hal.science/tel-01576433> (Accessed: 10 June 2023).
- Wang, M. *et al.* (2021) 'Outgrowth of the axillary bud in rose is controlled by sugar metabolism and signalling', *Journal of Experimental Botany*. Edited by P. Cubas, 72(8), pp. 3044–3060. doi:10.1093/jxb/erab046.

RÉSUMÉ

Les miARNs (microARNs) sont une classe de petits Acides RiboNucléiques pouvant jouer un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle d'un grand nombre de gènes. Ces miARNs sont impliqués dans la stabilité du génome et la communication cellulaire et peuvent intervenir dans le contrôle du développement des plantes, en particulier le débourrement. Le rosier étant dépendants des conditions lumineuses, l'étude présentée s'est intéressée aux potentiels microARNs impliqués dans le débourrement de bourgeons en lien avec le photo-contrôle de Rosa 'Radrazz'. Les miARNs miARN319a1.1 et miARN319a1.2 ont été identifiés comme étant des miARNs jouant un rôle dans la régulation post-transcriptionnelles du débourrement. Cette étude vise à poursuivre l'hypothèse de Julie Mallet concernant le rôle de ces miARNs dans le photo-contrôle.

Cela permettrait de déterminer les voies de signalisation impliquées dans le phénomène, telles que le métabolisme des sucres, des hormones ou bien même BRC1, et de pouvoir envisager la maîtrise de l'architecture des plantes par les horticulteurs. Ainsi, les miARNs permettrait d'envisager une horticulture plus responsable et efficace, tout en respectant l'environnement.

mots-clés : miARNs, rosier, débourrement, ramification, photo-contrôle

ABSTRACT

miRNAs (microRNAs) are a class of small RiboNucleic Acids that are involved in the post-transcriptional regulation of many genes. These miRNAs are involved in genome stability and cell communication and can play a role in controlling plant development, particularly budbreak. As roses are dependent on light conditions, this study looked at the potential microRNAs involved in budbreak in relation to the photo-control of Rosa 'Radrazz'. The miRNAs miRNA319a1.1 and miRNA319a1.2 were identified as miRNAs playing a role in the post-transcriptional regulation of budbreak. This study aims to pursue Julie Mallet's hypothesis concerning the role of these miRNAs in photo-control.

This would allow to determine the signalling pathways involved in the phenomenon, such as the metabolism of sugars, hormones or even BRC1, and to envisage the control of plant architecture by horticulturists. In this way, miRNAs could make horticulture more responsible and efficient, while respecting the environment.

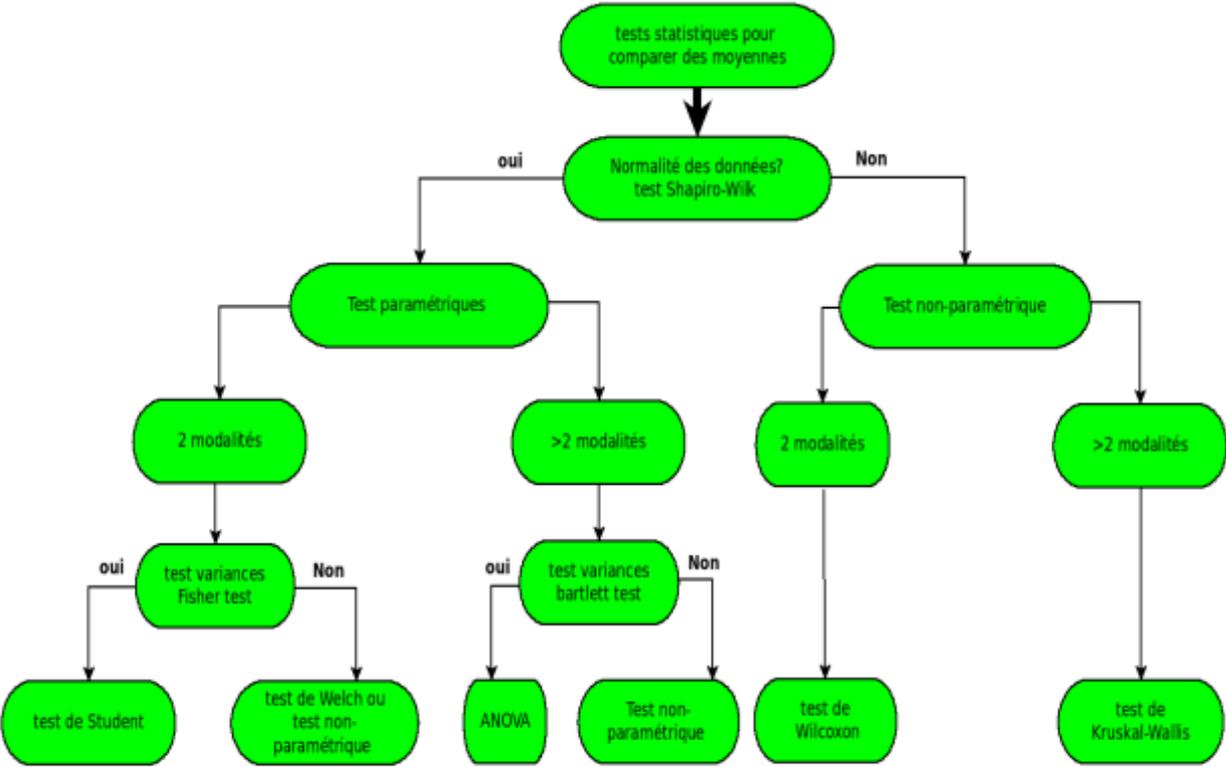
keywords : miRNAs, rosebush, budbreak, branching, photo-control

ANNEXES

Annexe I : Séquences de l'ensemble des amorces qPCR et de RT utilisés

Les amorces de l'UBC sont le couple permettant à l'UBC d'être le gène de référence de la qPCR. Rh : *Rosa hybrida*, F : Amorce sens, R : Amorce antisens, RT : Reverse Transcription (Transcription Inverse), Tm : Température de fusion.

Catégorie	Nom	Numéro d'accèsion	Amorces (5'-3')	Tm (°C)
RT-PCR	RhGAPDH-F-RTPCR		ATCCATTCATCACCACCGACTACA	61.0
RT-PCR	RhGAPDH-R-RTPCR		GCATCCTTACTTGGGGCAGAGA	62.1
qPCR	qRhUBC-F	RC7G0173600	GCCAGATTGCCCATATGTA	57.9
qPCR	qRhUBC-R	RC7G0173600	TCACAGAGTCCTAGCAGCACA	59.8
qPCR	Pre-miR319a1.1-F	RC7G0175600	CACCGTATTAGTGGTATTGAAGGAAGGG	65.1
qPCR	Pre-miR319a1.1-R	RC7G0175600	TAAGAGGGAATTAGATAAGGGAGC	59.3
qPCR	Pre-miR319a1.2-F	RC5G0635700	CACCCTTGCTTGTATGATGCAGAAGG	65
qPCR	Pre-miR319a1.2-R	RC5G0635700	GGATGAGAACACCTATGTGAC	57.9



Annexe III : Tableau des différents dosages d'ARN au Nanodrop et volume nécessaire d'ARN pour la RT selon les échantillons d'ARN prélevés par Julie Mallet lors de sa thèse. « B3 » le numéro du bourgeon, « t » le point de cinétique après décapitation du bourgeon, « L1-L2-L3 » le numéro de lot et « L-D » la condition de lumière. La dilution des échantillons d'ARN sont nécessaires une fois que la concentration dépasse 500 ng/μL. Les ratios 260/280 et 260/230 indiquent la pureté des échantillons vis-à-vis des protéines et des polyphénols respectivement. Les échantillons entourés en jaune nécessiteront d'être prélevés selon la dilution adéquate.

Dosage RNA nanodrop			Dilution			RT reaction			
ng/μL	260/280	260/230	D2	D5	D10	Amount of treated ARN (ng)	volume ARN purificated sample	H2O for 16 μL	Nom échantillon
442	2.08	2.03				500	1.13	14.87	B3t0L1
239.4	2.02	1.85				500	2.09	13.91	B3t3LL1
335.6	2.06	1.98				500	1.49	14.51	B3t3DL1
453.9	2.09	2.17				500	1.10	14.90	B3t6LL1
701.2	2.08	2.11		140.24		500	3.57	12.43	B3t6DL1
458.3	2.04	1.87				500	1.09	14.91	B3t10LL1
335.2	2.07	2.02				500	1.49	14.51	B3t10DL1
236.1	2.06	2				500	2.12	13.88	B3t24LL1
423.3	2.09	2.12				500	1.18	14.82	B3t24DL1
1247.7	2.08	2.07				500	0.40	15.60	B3t48LL1
777.5	2.08	2.1				500	0.64	15.36	B3t48DL1
1121.9	2.11	2.19				500	0.45	15.55	B3t72LL1
712.4	2.09	2.12				500	0.70	15.30	B3t72DL1
2775.9	2.14	2.27			277.59	500	1.80	14.20	B3t96LL1
387.2	2.09	2.13				500	1.29	14.71	B3t96DL1
381.6	2.07	2.08				500	1.31	14.69	B3t0L2
553	2.07	2.1				500	0.90	15.10	B3t3LL2
129	1.99	1.58				500	3.88	12.12	B3t3DL2
394.1	2.08	2.08				500	1.27	14.73	B3t6LL2
520.9	2.07	2.15	260.45			500	1.92	14.08	B3t6DL2
164.5	2.05	2.12				500	3.04	12.96	B3t10LL2
328.4	2.06	2.11				500	1.52	14.48	B3t10DL2
119.2	2.05	2.05				500	4.19	11.81	B3t24LL2
165.8	2.04	2.1				500	3.02	12.98	B3t24DL2
365.7	2.07	2.13				500	1.37	14.63	B3t48LL2
482.5	2.08	2.05				500	1.04	14.96	B3t48DL2
547	2.07	2.19				500	0.91	15.09	B3t72LL2
516.8	2.04	1.99				500	0.97	15.03	B3t72DL2
1617.1	2.1	2.2			161.71	500	3.09	12.91	B3t96LL2
350.5	2.06	1.99				500	1.43	14.57	B3t96DL2
448	2.1	2.11				500	1.12	14.88	B3t0L3
155	1.97	1.68				500	3.23	12.77	B3t3LL3
155.7	2	1.88				500	3.21	12.79	B3t3DL3
200.8	2.02	1.9				500	2.49	13.51	B3t6LL3
121.5	2.07	2.07				500	4.12	11.88	B3t6DL3
113.8	1.78	1.2				500	4.39	11.61	B3t10LL3
223.4	2	1.87				500	2.24	13.76	B3t10DL3
224.5	2.08	2.18				500	2.23	13.77	B3t24LL3
326.4	2.07	2.1				500	1.53	14.47	B3t24DL3
1100.7	2.1	2.26				500	0.45	15.55	B3t48LL3
585.85	2.07	2.18				500	0.85	15.15	B3t48DL3
1966.6	2.12	2.32				500	0.25	15.75	B3t72LL3
674.9	2.02	1.74				500	0.74	15.26	B3t72DL3
2843.7	2.1	2.17			284.37	500	1.76	14.24	B3t96LL3
491	2.06	1.98				500	1.02	14.98	B3t96DL3