

Table des matières

EFFET DES MICROARNS DANS LE PHOTOCNTRÔLE DU DÉBOURREMENT CHEZ LE ROSIER. 1

1.	Introduction	1
1.1.	La rose en France et en Anjou	1
1.1.1.	La rose en France et en Anjou	1
1.1.2.	L'IRHS : un pôle recherche à Angers	1
1.2.	Le mécanisme du débourrement chez le rosier	2
1.2.1.	Le bourgeon	2
1.2.2.	Les différents types de dormance et leur levée.....	3
1.3.	Micro-ARNs et développement.....	4
1.3.1.	Les miARNs	4
	a) Biosynthèse	4
	b) Le système de régulation de leurs transcrits cibles	4
1.3.2.	Les miARNs dans la ramification	5
1.3.3.	miARNs et miPEPs.....	5
1.4.	Objectifs	5
2.	Matériel et méthode.....	6
2.1.	Matériel végétal	6
2.2.	Extraction d'ARNs	6
2.3.	Purification des petits ARNs.....	6
2.4.	Élaboration des amorces RT et qPCR	7
2.4.1.	Amorces stemloop RT et qPCR.....	8
2.4.2.	Amorces two-tailed RT et qPCR	8
2.4.3.	Amorces qPCR classique	8
2.4.4.	Structure secondaire des amorces de RT	8
2.5.	RT (rétrotranscription).....	9
2.5.1.	RT stemloop	9
2.5.2.	RT two-tailed	9
2.6.	Analyse bioinformatique	9
2.7.	Analyse des résultats de qPCR.....	9
2.8.	Analyse statistique	10
3.	Résultats	10
3.1.	Identification miARNs et gènes cibles orthologues du rosier.....	10
3.1.1.	miR156a et deux de ses gènes cibles SPL6 et SPL13a.....	10
3.1.2.	miR171c et SCL6	10
3.2.	Cinétique de l'élongation du bourgeon sous luminosité faible/forte.....	11
3.3.	Extraction des ARNs totaux	12
3.3.1.	Vérification qualitative et quantitative ARNs totaux extraits	12
3.4.	Purification petits ARNs	12
3.4.1.	Vérification qualitative et quantitative ARNs purifiés	12
3.5.	Obtention et test des amorces de RT	13
3.5.1.	Amorces stemloop	13
3.5.2.	Amorces two-tailed	13
3.6.	Profil d'expression du précurseur de miR156a et gènes cibles.....	14
3.6.1.	Cinétique d'expression du prémiR156a dans les bourgeons et les nœuds	14
3.6.2.	Cinétique d'expression de SPL6 dans les bourgeons.....	14
4.	Discussion	15
4.1.	Un miARN en lien avec la ramification	15
4.2.	Pertinence des techniques utilisées pour l'amplification des miARNs matures	16
4.2.1.	L'isolement des petits ARNs	16
4.2.2.	L'extraction sans kit d'ARNs totaux	16
4.2.3.	Comparaison des techniques de RT stemloop et two-tailed.....	17
4.3.	Difficultés rencontrées	18
4.3.1.	Matériel végétal et maladie	18

4.3.2.	Résultats de phénotypage non significatifs.....	18
5.	Conclusions et perspectives.....	19
5.1.	Conclusion	19
5.2.	Perspectives	19
6.	Bibliographie.....	21

Table des illustrations

- Figure 1** : Biogenèse des miARNs chez les plantes (Budak and Akpinar, 2015).
Figure 2 : Interaction d'un miARN avec son transcrit cible (Bertoli et al., 2015).
Figure 3 : Implication de différents miARNs dans des processus de développement chez la plante (Li et Zhang, 2016).
Figure 4 : Rôles des miPEPs dans la biogenèse des miARNs (Li et al., 2017).
Figure 5 : Expression du miR165a et de ces gènes cibles dans les racines d'*A. thaliana* en fonction de la concentration en miPEP165a appliquée.
Figure 6 : Schéma de prélèvement des différents bourgeons (B) et nœuds (N) le long de l'axe.
Figure 7 : Bande de gel contenant la portion de miARNs d'un échantillon d'ARN total après électrophorèse dans tampon TBE 1X sur gel d'acrylamide dénaturant 15 %.
Figure 8 : Principe de l'élaboration et du fonctionnement des amorces RT et qPCR stemloop (Varkonyi-Gasic et Hellens, 2011).
Figure 9 : Principe de la RT qPCR two-tailed (Androvic et al., 2017).
Figure 10 : Implication de miRNAs dans la ramification (Blein et Laufs, 2016).
Figure 11 : Cinétique de l'élongation des bourgeons en PAR fort et PAR faible.
Figure 12 : Cinétique du débourrement des bourgeons en PAR fort (a) et PAR faible (b).
Figure 13 : Résultats d'électrophorèse d'échantillon ARN totaux au bioanalyseur.
Figure 14 : Profils d'électrophorèse de différents échantillons d'ARNs extraits selon le protocole communiqué par François Barbier (échantillons A. Porcher).
Figure 15 : Résultats graphiques de l'électrophorèse au bioanalyseur de petits ARNs sur une puce à miARNs.
Figure 16 : Melting curves obtenues sur échantillons d'ADNc issus d'ARNs totaux (tADNc) ou d'ARNs purifiés (sADNc), avec différents couples d'amorces.
Figure 17 : Structures secondaires probables du primer stemloop (a) et two-tailed (b) pour U6sn calculée par les outils de prédiction de conformation ARN Fold et MaxExpect.
Figure 18 : Cinétique d'expression du pré-miR156a dans les nœuds (a) et les bourgeons (b).
Figure 19 : Cinétique d'expression du gène cible SPL6 dans les bourgeons. Les courbes représentent
Figure 20 : valeurs moyennes de Cq dans les échantillons d'ADNc totaux (1) ou purifiés (2)
Figure 21 : Niveau d'expression du miR156a dans les échantillons de tADNc (1) et sADNc (2)

Annexes

Annexe I : séquences de l'ensemble des primers qPCR et de RT utilisés

Annexe II : Récapitulatif de quantification et ratios de pureté des échantillons ARN

Liste des abréviations

A : adénosine
ADN : acide désoxyribonucléique (=DNA)
ADNc : ADN complémentaire (=cDNA)
AGO : protéine argonaute
ARN : acide ribonucléique (=RNA)
ARNm : ARN messenger
B1: bourgeon 1
B2: bourgeon 2
B3: bourgeon 3
B4: bourgeon 4
BFV: bourgeon floral visible
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool (Outil de recherche d'alignements locaux)
Cq : quantification cycle (=Ct, threshold cycle)
DTT: dithiothréitol
G: guanosine
INRA : institut national de recherches en agriculture
IRHS : Institut de recherche en horticulture et semences
miARN: micro ARN (=miR)
miPEP : micropeptide
ml : millilitre
mm : millimètre
N1 : nœud 1
N2 : nœud 2
N3 : nœud 3
N4 : nœud 4
ng : nanogramme
FT : facteur de transcription
ORF : open reading frame (= cadre de lecture ouvert)
PAR : photosynthetically active radiation
PCR : Polymerization chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
prémiARN : précurseurs de micro ARN (=prémiR)
primiARN : micro ARN primaires
qPCR : PCR quantitative
RISC : RNA induced silencing complex
RNase : ribonucléase
RT : rétrotranscription
µl : microlitre
M : molaire

"See, my child, a man knows truly what he has loved best on earth only when in his last days he finds it still in his heart. Like the rest of the world, I have thought that I adored and detested many men and many things. In reality, I have loved only Napoléon and roses. Today, after nearly a century of rebellion against all the evils which I have suffered, there remain to me only two objects of profound hatred: the English, who overthrew my idol, and the white worms that have destroyed my roses" Jean-Pierre Vibert (1777-1866)

Effet des microARNs dans le photocontrôle du débourrement chez le rosier.

1. Introduction

1.1. La rose en France et en Anjou

1.1.1. La rose en France et en Anjou

L'horticulture ornementale française est un secteur dans lequel la rose tient une place économique importante. Le rosier représente 2 % des ventes en volume et 9 % du chiffre d'affaire du secteur. L'attrait des particuliers et des professionnels de différents secteurs (fleurs coupées, fleurs en pots d'intérieur ou d'extérieur, fleurs de pleine terre, parfumerie, industrie cosmétique) ne fléchit pas. Les français continuent à aimer et à acheter cette plante indémodable et emblématique de nos jardins. La rose s'ancre dans l'histoire angevine depuis le XIX^{ème} siècle, puisque c'est l'arrivée à Angers du rosieriste Jean-Pierre Vibert en 1839 qui donnera à la région sa future renommée dans le domaine. Depuis, la création variétale, les nombreuses avancées et recherches sur le rosier, et notamment le rosier buisson, ont contribué à faire de l'Anjou l'un des centres de production de la rose, hissant même la région à la première place (60 % de la production française est angevine, devant la production Sud-Ouest).

Le genre *Rosa* regroupe plus d'une centaine d'espèces et des milliers de cultivars. L'hybridation entre ces derniers est très fréquente chez les rosiers de jardin et rend ardues les tentatives de délimitation botanique. Les rosiers d'ornement sont ainsi souvent regroupés sous l'appellation générique « *Rosa hybrida* », non fondée sur la classification phylogénique. Les rosiers de jardin fleurissent dans toutes les villes de France une bonne partie de l'année. Avec comme vocation principale un esthétisme allant du classique au moderne, ils doivent s'inscrire avec aisance dans tous les environnements où on les rencontre, en zones rurales comme urbaines. C'est essentiellement la composante esthétique de cette plante qui a fait et fait toujours l'objet d'une sélection minutieuse et qui nécessite de sans cesse repenser son architecture au gré des tendances et des besoins des consommateurs et c'est dans un environnement en pleine mutation que doit maintenant s'inscrire le rosier de demain.

1.1.2. L'IRHS : un pôle recherche à Angers

L'Institut de Recherche en Horticulture et Semences (IRHS), est une structure récente regroupant la tutelle de l'Institut national de recherche en Agriculture (INRA), d'Agrocampus Ouest et de l'université d'Angers. Elle présente 3 pôles et 13 équipes de recherche mettant en commun leurs expertises pour répondre à des problématiques fondamentales et stratégiques en lien avec la biologie et la physiologie des semences et plantes horticoles. Le pôle "Architecture et Floraison sur Rosiers et Autres Ornementales" concentre actuellement l'effort de ses équipes de recherche sur le rosier. L'équipe "Biologie Intégrative d

L'Interaction Architecture et Environnement" (ARCH-E) a pour objectif de définir les bases moléculaires du contrôle du débourrement et de la croissance des rameaux par différents facteurs de l'environnement et plus particulièrement par la lumière. La ramification de la plante, et donc son architecture, dépendent du débourrement. C'est en effet la composante architecturale du rosier qui est au centre de la recherche, car d'elle dépend l'aspect général de la plante. Le port du rosier, la vigueur de ses axes ou son caractère buissonnant font l'identité du rosier au même titre que sa floribondité ou encore la couleur ou le parfum de ses fleurs. C'est d'ailleurs l'un des critères majeurs de choix du consommateur lorsqu'il regarde une plante ornementale.

1.2. Le mécanisme du débourrement chez le rosier

L'architecture d'une plante est la résultante des interactions entre les facteurs génétiques et les facteurs environnementaux. Au sein de réseaux de signalisation moléculaire complexes et encore partiellement connus, le mécanisme du débourrement s'inscrit comme l'un des axes majeurs de recherche en la matière. C'est en effet en grande partie le fonctionnement des bourgeons et leur propension à débourrer qui détermine le port futur de la plante. Le débourrement est en soi un phénomène complexe, avec des réponses spécifiques face à un grand nombre de mécanismes de régulation signalétiques et nutritionnels. Il se définit par l'émergence de la première feuille hors de la couche écailleuse du bourgeon. Cela nécessite la levée de la dormance qui permet la libération des différentes structures contenues dans le bourgeon puis la reprise de sa croissance par réactivation de l'activité méristématique. À la différence d'autres espèces dont les bourgeons débourrent même à l'obscurité comme la tomate ou le peuplier, chez le rosier la lumière est une condition *sinequanone* au débourrement (Girault *et al.*, 2008). Par ailleurs le bourgeon est le site de perception de la lumière (Leduc *et al.*, 2014).

1.2.1. Le bourgeon

Une plante est par nature immobile et doit sans cesse s'adapter à son environnement. Elle est en permanence en compétition avec d'autres espèces végétales pour les ressources nutritives, la lumière et l'eau, comme c'est le cas dans une forêt ou un massif de fleurs. Ce sont également les paramètres physico-chimiques de son environnement, comme le relief ou les conditions climatiques qui conditionnent sa capacité à se développer d'une façon ou d'une autre. C'est pour ces raisons que des mécanismes lui permettant d'occuper l'espace de façon optimale sont essentiels. Le développement de nouveaux axes doit ainsi être finement régulé car il a un effet important sur la capacité d'une plante à s'adapter à son environnement. Les méristèmes à l'origine des axes en développement peuvent soit produire immédiatement un rameau (rameau sylleptique) soit entrer en dormance au sein d'une structure spécialisée, le bourgeon, pour donner des rameaux proleptiques. Le bourgeon est une structure écailleuse complexe comprenant les ébauches foliaires et éventuellement florales du futur axe. Elles entourent le méristème apical caulinaire (MAC). L'ensemble s'organise autour d'un axe constitué de l'empilement des différents entre-nœuds. Les bourgeons aériens sont situés à l'aisselle des feuilles (bourgeons axillaires). Les phénomènes régulant la croissance du

bourgeon et son débourrement s'inscrivent à la fois dans le patrimoine génétique de la plante mais également comme médiateurs à l'interface entre la plante et son environnement. C'est en particulier la suspension temporaire de la capacité du bourgeon à débourrer qui entre en jeu dans cette situation. C'est le phénomène de dormance.

1.2.2. Les différents types de dormance et leur levée

Le programme de devenir par défaut du bourgeon est la croissance. Ce sont donc principalement des mécanismes d'inhibition du débourrement pour le maintien de la dormance qui sont mis en place pour contrôler le phénomène (Horvath, 2010). Ce sont les raisons du maintien de cette dormance et les conditions pour les lever qui en définissent la nature. Trois différents types de dormance ont ainsi été décrits (Lang *et al.*, 1987). Ils ne s'excluent pas mutuellement et peuvent également se succéder. Horvath (2010) en donne les définitions suivantes :

L'endodormance

Dans ce cas, c'est au sein même du méristème qu'agissent des facteurs inhibant la croissance du bourgeon. Ce type de dormance peut être mis en évidence lorsque le bourgeon ne débourre pas même pris isolément du reste de la plante (pas de paradormance) ou placé en conditions environnementales favorables (pas d'écodormance).

L'écodormance

Cette dormance est sous l'influence de facteurs environnementaux. Lorsque ceux-ci ne sont pas propices à la croissance, le bourgeon reste quiescent. L'origine de cet arrêt de croissance visible peut par exemple être liée à un stress hydrique, thermique ou à un milieu carencé en nutriments. La reprise de croissance s'initie au retour de conditions favorables.

La paradormance

Dans le cadre de la paradormance, le méristème est sous l'influence de signaux intrinsèques à la plante mais externes au bourgeon-même. Ils proviennent d'autres organes plus ou moins proches et répriment le débourrement, comme c'est le cas dans le phénomène de dominance apicale. Dans cet exemple précis, le bourgeon situé à l'apex de la tige réprime le débourrement des bourgeons axillaires placés sur l'axe.

La dormance est levée par des mécanismes complexes et fonction de sa nature. Il peut être difficile de différencier les leviers du phénomène en raison des besoins parfois similaires pour rompre les différentes dormances. L'écodormance et l'endodormance par exemple, peuvent toutes les deux nécessiter des conditions de températures particulières pour être levées. Dans l'ensemble la saisonnalité des régions tempérées participe de façon importante aux phénomènes de levée de dormance du bourgeon. On peut également citer certains facteurs nutritionnels comme leviers de la levée de dormance et de la reprise de l'activité des méristèmes.

1.3. Micro-ARNs et développement

1.3.1. Les miARNs

Les miARNs (micro-ARNs) sont de petits ARNs (acides ribonucléiques) endogènes non codants de 20 à 24 nucléotides. Ils ont été découverts en 1993 chez *C. elegans* (Lee *et al.*, 1993) et caractérisés une dizaine d'années plus tard. Ils jouent un rôle prépondérant dans la régulation post-transcriptionnelle d'un grand nombre de gènes, et notamment des gènes codant des facteurs de transcription (FT). Ils seraient impliqués dans la régulation de près de 30 % des gènes du génome végétal, et possiblement dans l'ensemble des phénomènes biologiques rencontrés au cours de la vie de la plante (Budak and Akpinar, 2015).

a) Biosynthèse

Les miARNs sont codés par le génome nucléaire des plantes. Les gènes codant ces miARNs peuvent être situés dans des régions "non-codantes" du génome ou dans des régions introniques d'autres gènes. Ils sont ensuite transcrits par l'ARN polymérase II (figure). Les longs transcrits en résultant sont appelés miARNs primaires (primiARNs ou primiRs). Ces primiRs ont une structure tige-boucle et possèdent une queue polyA (queue poly-adenosine) ensuite clivés dans des corps nucléaires dédiés (dicing bodies en anglais) par un complexe protéique majoritairement composé de DICER-LIKE 1 (DCL1), HYPONASTICLEAVES 1 (HYL1) et SERRATE (SE) (Yu *et al.*, 2017). Le clivage des primiRs donne de précurseurs de miARNs (prémiARNs ou prémiR). Ceux-ci sont plus petits (de 60 à 80 nucléotides) et présentent également une structure tige-boucle (figure 1). Le complexe de clivage excise ensuite la boucle du prémiR ainsi que les extrémités 5' de chacun des brins en résultant. Cette étape peut intervenir de la base vers la boucle ou plus rarement de la boucle vers la base (Budak and Akpinar, 2015). Il en résulte un miARN double-brin qui est stabilisé par 2-O-méthylation des extrémités 3' de chaque brin par la protéine HEN1 (figure 1). Cette protéine favoriserait également son export vers le cytoplasme par la protéine HASTY (Budak and Akpinar, 2015). Une fois dans le cytoplasme, les brins se séparent et le brin guide est chargé par le RNA-induced silencing complex (RISC) grâce à son interaction avec la protéine argonaute (AGO).

b) Le système de régulation de leurs transcrits cibles

Pour agir sur les transcrits-cibles, les miARNs matures sont préalablement chargés dans un complexe RISC, constitué de plusieurs protéines et notamment la protéine Argonaute (figure 1). Ils agissent par appariement plus ou moins parfait avec les ARNs messagers (ARNm) de leurs gènes cibles et induisent ainsi leur clivage puis leur dégradation si la complémentarité est parfaite ou presque ou le blocage de la traduction si l'appariement est partiel (figure 2 ; Bertoli *et al.*, 2015). C'est le cas chez les animaux, mais chez les plantes l'appariement est le plus souvent presque parfait et entraîne le clivage et la dégradation de son ARNm cible.

Canonical miRNA biogenesis

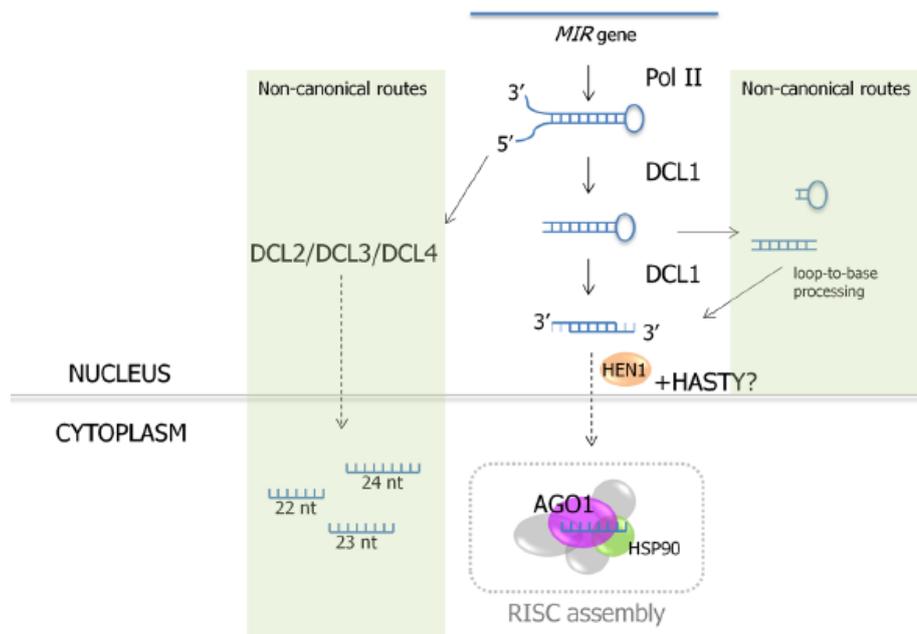


Figure 1 : Biogenèse des miARNs chez les plantes (Budak and Akpinar, 2015).

Il existe deux voies de biosynthèse des miARNs chez les plantes. La voie canonique fait intervenir la protéine DCL1 (Dicer Like 1) qui clive le miARN primaire (pri-miR) en un précurseur (pré-miR). Celui-ci est ensuite à nouveau clivé par DCL1, classiquement de la base vers la boucle. Néanmoins, un clivage se faisant depuis la boucle vers la base est également possible. Il en résulte la formation d'un miARN mature double brin. Il est stabilisé par l'intervention de la protéine HEN1 puis exporté vers le cytoplasme (export généralement attribué à la protéine HASTY, même si cela est remis en cause par certaines études). Le brin guide du miARN est ensuite chargé par le complexe RISC composé notamment d'une protéine argonaute (AGO1) et d'une protéine de choc thermique, HSP90. La voie canonique de biosynthèse des miARNs génère classiquement des miARNs matures de 21 nucléotides chez *Arabidopsis*, mais des voies non canoniques font intervenir d'autres protéines de la famille DCL (DCL2, 3 et 4) à la place de DCL1 lors des phases de clivage. Ces protéines génèrent des miARNs matures de 22 à 24 nucléotides.

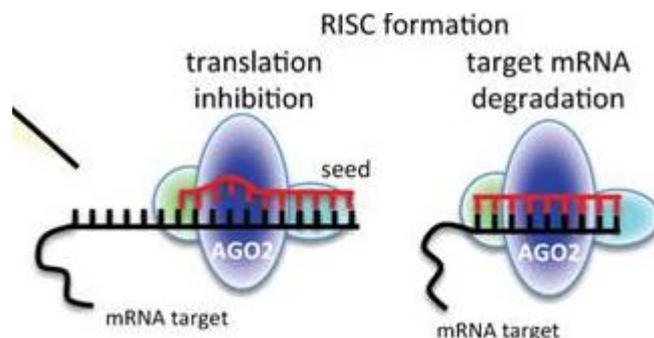


Figure 2 : Interaction d'un miARN avec son transcrit cible (Bertoli *et al.*, 2015)

Le miARN, chargé au sein du complexe RISC, s'apparie avec son transcrit cible et inhibe la traduction (droite) ou entraîne le clivage et la dégradation de sa cible (gauche) en fonction de la complémentarité plus ou moins grande entre les deux séquences.

1.3.2. Les miARNs dans la ramification

À l'heure actuelle, très peu de choses sont connues sur la régulation de la ramification des plantes par les miRNAs et, encore moins en réponse à des conditions néfastes d'éclaircissement. Quelques études récentes ont cependant identifié le rôle de certains miARNs avec leurs gènes cibles (modules miRNAs/ARNm) dans ce processus. À ce jour dans la littérature, la ramification serait contrôlée négativement par le miR171 (Wang *et al.*, 2010) et positivement par les miR156, miR157, miR529, miR393 et miR444 (Figure 3 ; Huijser et Schmid, 2011, Li et Zhang, 2016, Guo *et al.*, 2013, Wang *et al.*, 2015).

1.3.3. miARNs et miPEPs

Des études récentes ont montré la présence de petits cadres de lecture ouverts (ORF) permettant la traduction de petits peptides (miPEPs) au sein de la séquence des miARNs primaires (primiARNs ou primiRs) (Lauressergues *et al.*, 2015). Ces miPEPs sont impliqués dans l'augmentation de la transcription des primiRs les codants, entraînant ainsi une augmentation de la quantité de miARN matures (figure 4 ; Li *et al.*, 2017). Cela a été observé par application exogène dans le cas des miPEP171b et miPEP165a qui entraînent l'accumulation des miR171b et miR165a chez *Medicago truncatula* et *Arabidopsis thaliana* respectivement (Lauressergues *et al.*, 2015). Plus récemment, miPEP172c a été impliqué dans le processus de nodulation (Couzigou *et al.*, 2016). L'accumulation du miARNs est proportionnelle à la quantité de miPEP appliquée (figure 5). L'étude de l'implication des miPEPs sur la croissance racinaire d'*A. thaliana* a permis de révéler que l'application du miPEP165a entraînait une accumulation du miR165a dans les racines conduisant à une régulation négative de l'expression de leurs gènes cibles. Ces derniers étant impliqués dans le développement racinaire, une inhibition de la croissance des racines a été constatée. Les auteurs ont alors envisagé la possibilité de maîtriser certains traits agronomiques grâce aux miPEPs.

1.4. Objectifs

L'objectif de ce stage de master 1 a été de constituer un socle de résultats préliminaires au projet de thèse « Rosa miPEPs et miRNAs : de nouveaux outils respectueux de l'environnement pour contrôler la ramification des plantes ? ». Ce projet concerne les aspects économiques et écologiques de la gestion de l'architecture de la plante. Celle-ci est en effet, à ce jour, coûteuse en main-d'œuvre (taille) ou en intrants ayant un impact environnemental néfaste. C'est sur ce point particulier qu'interviennent les miARNs, qui pourraient constituer, à l'avenir, des outils d'intérêt pour maîtriser l'architecture d'une plante au travers de l'utilisation de régulateurs d'expression tels que les micro-peptides. Des miARNs candidats et quelques-unes de leurs cibles potentiellement impliquées dans le débourrement ont été recherchés dans le cadre de ce travail préliminaire. Un autre des objectifs a été de tester et/ou de mettre au point des protocoles d'extraction et de rétrotranscription des miARNs permettant une étude d'expression quantitative fiable et

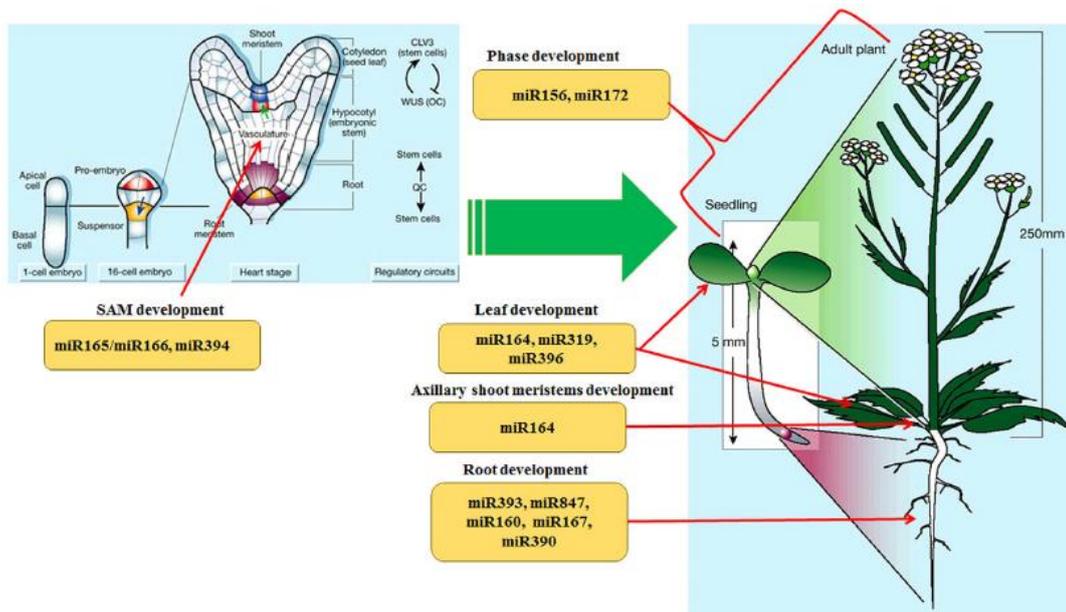


Figure 3: Implication de différents miARNs dans des processus de développement chez la plante (Li and Zhang, 2016). Le schéma indique l'implication de miARNs dans divers processus biologiques. miR165, 166 et 394 seraient ainsi impliqués dans le développement du méristème apical caulinaire (MAC=SAM en anglais). Les miRs 390, 167, 160, 393 et 847 ont plutôt une action sur le développement racinaire, le miR164 sur celui des méristèmes situés dans les bourgeons axillaires et celui des feuilles avec les miR319 et 396. Enfin, les miR156 et miR172 seraient impliqués dans les phases de développement intervenant transitoirement entre le stade juvénile et le stade adulte.

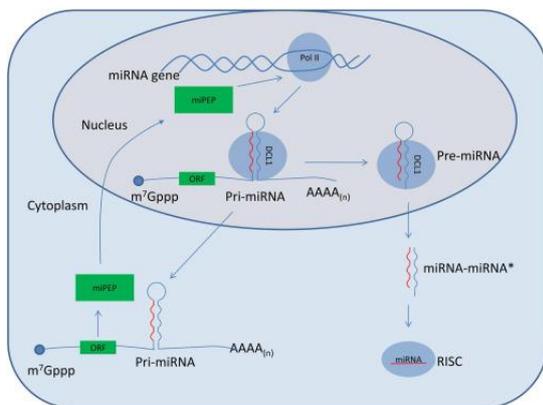


Figure 4 : Rôles des miPEPs dans la biogenèse des miARNs (Li et al., 2017). Le miPEP est codé par de petits ORF contenus dans la séquence du priméR. Ils stimulent ensuite la transcription du gène codant ce priméR (boucle de régulation positive).

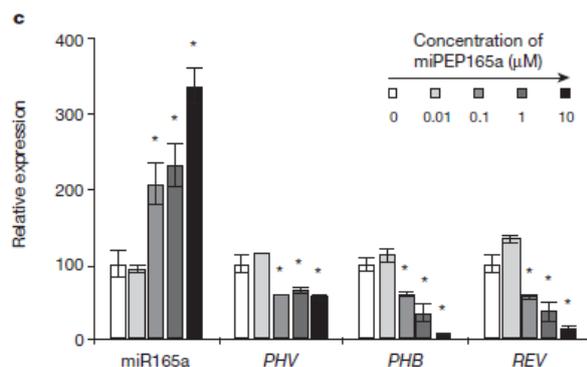


Figure 5 : Expression de *miR165a* et de ses gènes cibles dans les racines d'*A. thaliana* en fonction de la concentration en miPEP165a appliquée. Le graphique en barres présente le niveau d'expression relative du miR165a et de ces gènes cibles *PHV*, *PHB* et *REV* dans les racines d'*A. thaliana* de Laressergues et al. 2015..

reproductible par réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR). Un protocole expérimental visant à tester l'implication des miARNs choisis dans le photocontrôle du débourrement a aussi été mis au point.

2. Matériel et méthode

2.1. Matériel végétal

Des jeunes plants de *Rosa hybrida* " Radrazz ", ont été utilisés pour l'expérimentation, et trois lots biologiques ont été réalisés. Les plantes sont des clones issus de boutures de noeuds. Les premiers jours, les boutures sont placées dans des mottes de terreau sous tunnel à fort degré d'hygrométrie pour stimuler l'enracinement, puis repotées avant d'être cultivées sous serre. Lorsque les plantes ont développé 4 phytomères, elles sont placées en chambres bioclimatiques à 60-65 % d'humidité relative, à 22°C, selon une photopériode de 16h/8h (jour/nuit) sous une forte intensité lumineuse (photosynthetically active radiation de 350-400 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, PAR fort). Au stade « bourgeon floral visible » (BFV) cinq plantes témoins sont maintenues intactes et les autres plantes sont décapitées environ 8 mm au-dessus du 4ème phytomère (figure 6). La moitié du lot est transférée en PAR faible (80 à 90 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Les bourgeons et le fragment de tige à leur voisinage le long de l'axe (figure 6) sont prélevés immédiatement sur les témoins (T0) puis à 24h, 48h, 96h et 144h après décapitation sur 3 à 5 plantes sous les deux conditions d'intensité lumineuse. Les tissus végétaux ont été prélevés dans l'azote liquide et conservés à -20°C.

2.2. Extraction d'ARNs

L'extraction des ARNs a été effectuée selon un protocole mis au point par François Barbier (équipe Arch-E, communication personnelle, non publié). Celui-ci permet d'extraire une quantité appréciable d'ARNs de très bonne qualité à partir d'une très petite quantité de matériel végétal de départ (à partir de 5 mg, équivalent à 5 bourgeons). Contrairement à certains kits d'extraction, il permet également de ne pas perdre tout ou partie de la portion des petits ARNs qui nous intéresse ici. L'étude de vérification qualitative et quantitative des ARNs ainsi extraits a été réalisée par migration sur gel d'agarose et dosages au Nanodrop ou au Bioanalyseur (plateau technique ANAN). Une partie des ARNs testés a été fournie par Alexis Porcher, doctorant en deuxième année de thèse à l'IRHS. Ces ARNs sont issus de plantes placées dans les mêmes conditions de culture, mais uniquement en PAR fort, avec prélèvement en cinétique plus resserrée (T0, 1h, 3h, 6h, 24h, 48h et 96h).

2.3. Purification des petits ARNs

Les échantillons utilisés proviennent de rosiers de la variété « Radrazz ». Ils sont issus pour partie d'un mélange des bourgeons B1, B2, B3 et B4 ou des noeuds N1, N2, N3 et N4 cultivés in vitro et prélevés 48h après la mise en culture à l'obscurité ou la lumière. L'autre partie des échantillons provient des feuilles jaunes ou matures de jeunes plants cultivés en serre. Ces échantillons tests de tissus divers ont été utilisés pour purification et récupération de la portion des petits ARNs uniquement. Cette purification a été effectuée

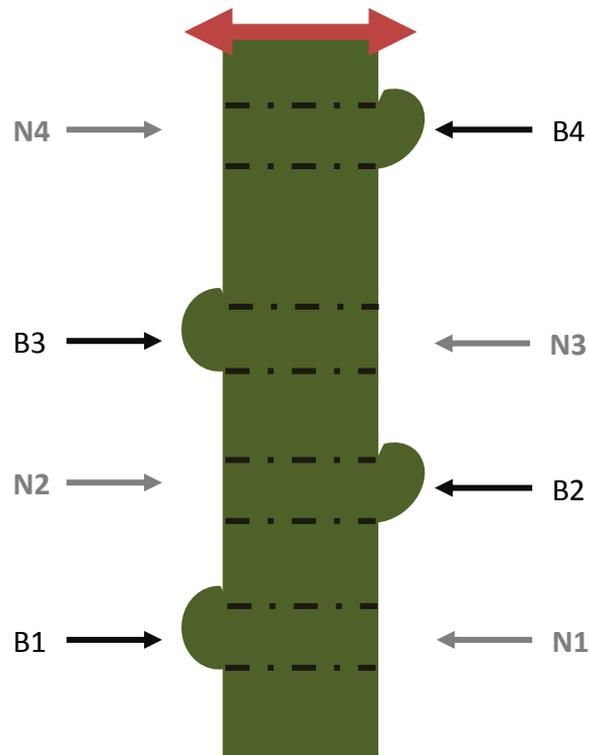


Figure 6 : : Schéma de prélèvement des différents bourgeons (B) et nœuds (N) le long de l'axe.

Les rosiers sont décapités (double flèche rouge) au stade bourgeon floral visible environ 8 mm au-dessus du quatrième bourgeon axillaire (B4). Les plantes ne sont pas défoliées mais par soucis de clarté, les feuilles ne sont pas représentées. Les nœuds adjacents (N1, N2, N3 et N4) correspondant aux différents bourgeons (B1, B2, B3 et B4) sont prélevés selon les traits pointillés représentés en noir.

selon le protocole « Gel purification of miRNA from total RNA » décrit par ThermoFischer Scientific (<https://www.fishersci.fr>)

Préparation du gel : gel d'acrylamide dénaturant 15% [1X TBE, urée 7M, 15% acrylamide (19:1 acryl:bis-acryl)]. Pour 15 mL : 6,3 g d'urée de haute qualité, 1,5 ml de TBE 10X, 5,6 ml d'acrylamide (19 acryl:1 bis-acrylamide) et compléter à 15 ml avec de l'eau distillée désionisée RNase free. Mélanger à température ambiante jusqu'à dissolution de l'urée et ajouter 75 µl de persulfate d'ammonium 10 % puis 10 µl de TEMED, mélanger rapidement et couler dans le moule immédiatement.

Électrophorèse

Chauffer le gel autour de 50°C par une pré-migration de 10 à 15 minutes dans un tampon TBE 1X. Préparer 5 à 50 µg d'ARN dans un volume égal de tampon de charge dénaturant et dénaturer à 95°C pendant 5 minutes puis mettre sur glace. Charger les échantillons après avoir lavé les puits du gel avec du tampon TBE 1X et lancer l'électrophorèse jusqu'à ce que la bande marquée par le bleu de bromophénol atteigne 4 ou 5 cm du bord inférieur du gel.

Élution

Découper pour chaque échantillon une bande de gel en partant juste au-dessus du milieu de la bande colorée par la xylène cyanol et en allant jusqu'aux trois quarts de la distance la séparant de la bande colorée par le bleu de bromophénol (figure 7). Placer la bande de gel dans un tube de 15 ml et ajouter 10 ml de NaCl 1M RNase free. Réduire le gel en petits morceaux (>1mm) à l'aide d'une lame de scalpel puis laisser le tube à 4°C toute la nuit sous agitation. Centrifuger 5 minutes à 2000Xg et transférer le surnageant dans un tube de 50 ml et stocker à 4 °C. Ré-éluer le gel dans 2 ml de NaCl 1M et laisser sous agitation 1 heure à température ambiante. Procéder à une centrifugation comme précédemment et récupérer le surnageant pour l'ajouter à celui récupéré en premier.

Purification des ARNs

Le protocole communiqué par François Barbier a été utilisé. Précipitation des ARNs dans de l'isopropanol, centrifugation à 4°C. Rinçage du culot à l'éthanol 70 % par centrifugation ; séchage du culot puis resuspension des petits ARNs purifiés dans de l'eau RNase free.

2.4. Élaboration des amorces RT et qPCR

Les séquences de l'ensemble des amorces (Eurofin Genomics) utilisées pour qPCR et RT sont présentées en Annexe I. Des amorces RT ont été utilisées pour permettre une rétrotranscription sensible et spécifique des miARNs cibles ainsi que de contrôles internes l'ubiquitine (UBC) et U6sn (petite ribonucléoprotéine nucléaire U6). Deux méthodes de rétrotranscription différentes ont été testées afin d'être comparées, la technique de stemloop et celle de two-tailed.



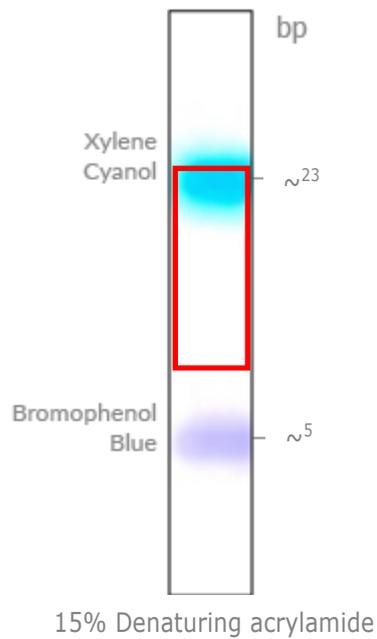


Figure 7 : Bande de gel contenant la portion de miARNs d'un échantillon d'ARN total après électrophorèse dans tampon TBE 1X sur gel d'acrylamide dénaturant 15 %. En bleu clair, la bande d'ARNs d'une taille d'environ 23pb (centre de la bande), avec laquelle co-migre le xylène cyanol. En bleu foncé, la bande correspondant aux ARNs d'une taille de 5 pb (milieu de la bande), avec laquelle co-migre le bleu de bromophénol. Le rectangle rouge correspond à la bande de gel à découper contenant les miARNs (longueur moyenne de 21 pb).

2.4.1. Amorces stemloop RT et qPCR

Les amorces stemloop RT et qPCR ont été réalisées d'après (Varkonyi-Gasic and Hellens, 2011). L'amorce RT stemloop est constituée d'une ossature universelle et d'une extension spécifique en 3'. Elle contient également la séquence de l'amorce qPCR antisens universelle. L'extension spécifique au miARN cible est constituée de 6 nucléotides correspondant à la séquence reverse complétée le l'extrémité 3' du miARN (figure 8 a). Ce primer forme une structure tige-boucle grâce à une autocomplémentarité dans la séquence de ses extrémités 3' et 5' (figure 8 b). L'amorce sens qPCR est spécifique au miARN mais exclut les 6 nucléotides de son extrémité 3' (figure 8 c). L'amorce antisens universelle est 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'.

2.4.2. Amorces two-tailed RT et qPCR

Les amorces RT two-tailed ont été créées selon le protocole d'Andovic *et al.* 2017. Ils ont une taille d'environ 50 nucléotides et doivent présenter une conformation tige-boucle et tenaille pour permettre l'adhésion des miARNs aux deux héli-sondes situées aux extrémités 3' et 5' de l'amorce (figure 9 A). Ces deux héli-sondes sont complémentaires des extrémités 5' d'une part et 3' d'autre part (figure 9 B). Elles sont de taille variable mais comprises entre 6 et 4 nucléotides pour l'hémisonde en 3' et 4 à 8 nucléotides pour l'hémisonde en 5' (Andovic *et al.*, 2017).

2.4.3. Amorces qPCR classique

Les autres amorces utilisées pour les prémiARNs et leurs gènes cibles ont été élaborées à l'aide du logiciel Geneious 11.1.3 à partir des séquences des ARNs à cibler.

2.4.4. Structure secondaire des amorces de RT

La validation de la structure secondaire des amorces de RT a été réalisée à l'aide du site <http://rna.urmc.rochester.edu>. Des structures secondaires probables ont été obtenues avec une échelle de couleur reflétant la probabilité pour chaque base d'être dans la conformation indiquée par rapport aux autres bases de la séquence. Chaque séquence a été testée par les trois outils de prédiction du site. L'outil Fold donne la ou les structures présentant l'énergie libre la plus faible, MaxExpect génère une ou des structures en fonction d'appariements de bases hautement probables et enfin ProbKnot indique la structure avec des appariements entre bases très probables mais également les possibles pseudo-nœuds pouvant apparaître dans la structure. Ces pseudo-nœuds correspondent à des appariements secondaires entre les bases de la structure tige-boucle et d'autres bases de la séquence. Ces structures sont beaucoup moins stables que les structures de type tige-boucle. Les amorces two-tailed ont été testées et optimisées de façon à avoir la conformation idéale pour la RT. Pour chaque amorce, a été retenue la séquence pour laquelle la structure

était la plus stable possible avec des probabilités élevées (au moins supérieures ou égales à 60 % pour moins de 20 % des bases et supérieure à 90 % pour au moins 80 % des bases). N'ont été retenues que les séquences remplissant ces conditions selon au moins deux des outils de prédiction utilisés probabilités élevées (au moins supérieures ou égales à 60 % pour moins de 20 % des bases et supérieure à 90 % pour au moins 80 % des bases). N'ont été retenues que les séquences remplissant ces conditions selon au moins deux des outils de prédiction utilisés.

2.5. RT (rétrotranscription)

La rétrotranscription classique s'appuie sur un système de rétrotranscription de l'ensemble des ARNms ayant une queue polyA. Ici, les transcrits d'intérêt sont d'une part de trop petite taille et d'autre part, les miARNs sont résistants à la polyadénylation en raison d'une 2'-O-méthylation de leur extrémité 3' (Yu *et al.* 2017). C'est pour ces raisons qu'un système spécifique doit être mis en place pour pouvoir avoir une RT sensible et conservatrice.

2.5.1. RT stemloop

Celle-ci a été réalisée telle que décrite par Varkanyi *et al.* Chaque réaction de RT a été effectuée avec une seule amorce par tube.

2.5.2. RT two-tailed

La RT two-tailed a été réalisée en multiplex, c'est à dire que toutes les amorces de RT ont été mises dans le même tube selon le protocole d'Androvis *et al.* 2017.

2.6. Analyse bioinformatique

Les miARNs candidats ont été recherchés à l'aide du génome du rosier dont la séquence annotée est disponible (Hibrand *et al.*, 2018). Pour cela, les miARNs d'espèces proches référencées sur miRbase (<http://www.mirbase.org/>) ont été utilisés comme matrice. Les séquences ainsi récupérées ont été blastées sur NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) et sur le transcriptome de *Rosa hybrida* (outil JBrowse accessible sur <https://www.rosaceae.org/tools/jbrowse>). Les résultats obtenus ont permis d'identifier les orthologues chez le rosier de pré-miARNs, ainsi que certains de leurs gènes cibles d'intérêt.

2.7. Analyse des résultats de qPCR

L'analyse des résultats de qPCR se fait sur plusieurs critères : l'aspect des melting curves d'abord, qui renseigne sur la qualité du résultat observé. Elles doivent ne présenter qu'un seul pic bien défini et une température de fusion constante permettant de conclure à une amplification effective et spécifique. Ensuite les Cq des répliquats techniques doivent être proches (moins de 1 Cq de différence entre eux). Enfin l'analyse de l'expression des gènes d'intérêt se fait en fonction d'un ou plusieurs contrôles internes (gènes de ménage par exemple) et par rapport à un contrôle interne (le point de cinétique ou la condition par rapport auxquels on souhaite comparer les autres points par exemple). La formule $[E_i^{(Cq_{ref} - Cq_{échantillon})}] / [E_r^{(Cq_{ref} - Cq_{échantillon})}]$

échantillon – Cq ref)] avec E_i et E_r les efficacité des couples d'amorces du gène d'intérêt et du gène de référence, respectivement. « Ref » indique l'échantillon auquel se réfèrent tous les autres.

2.8. Analyse statistique

Une analyse statistique a été effectuée sur les résultats issus de plusieurs réplicats biologiques et ou techniques pour les résultats d'expression de gènes. Dans tous les cas, un test de Student a été effectué avec une correction de Bonferroni.

3. Résultats

3.1. Identification miARNs et gènes cibles orthologues du rosier

3.1.1. *miR156a* et deux de ses gènes cibles *SPL6* et *SPL13a*

Le microARN 156a est souvent cité comme ayant un rôle prépondérant dans le développement des plantes (figure 10), notamment lors des phases de transition (passage du stade juvénile au stade adulte par exemple). C'est en particulier vrai dans les phénomènes de ramification (Blein and Laufs, 2016). Ce miARN est très conservé entre espèces et la séquence présente un fort pourcentage d'identité chez des plantes éloignées phylogénétiquement. Les transcrits cibles de gènes *SPL* orthologues sont également très conservés, notamment au niveau des sites d'appariement avec le miARN chez de nombreuses espèces comme le maïs ou la vigne (*Vitis vinifera* et *Zea mays*, Bari et al., 2013). Les gènes cibles choisis l'ont été en fonction de la conservation du site d'appariement au miARN156a. Leur niveau d'expression a aussi été étudié pour voir s'il corrélait inversement celui du pré-miARN156 dans un premier temps et celui des miARN156a matures dans un second temps.

3.1.2. *miR171c* et *SCL6*

Comme le miR156a, le miR171 a été très étudié et son implication dans les phénomènes de ramification a été mis en évidence par plusieurs études. Chez la tomate par exemple, une étude récente a montré que le gène *SIGRAS24*, gène orthologue aux gènes *SCL6* d'*A. thaliana*, était la cible du miR171 (Huang et al., 2017). Les phénotypes des mutants surexprimant ce gène étaient marqués par des modifications notamment au niveau de la taille des plantes, de l'architecture de leurs feuilles ou du nombre de branches latérales. Les auteurs de l'études ont aussi mis en évidence les effets de mutations de ce gène sur l'expression d'autres gènes impliqués dans les voies de signalisation hormonales liées à l'acide gibbérellique (GA) ou à l'auxine (AUX). Blein et Laufs, 2016, ont aussi montré le rôle de *SCL6* dans l'activité des méristèmes axillaires (figure 10). L'ensemble de ces résultats a orienté la recherche du miR171 et de son gène cible *SCL6* chez le rosier. Celui présentant la plus grande identité avec celui d'*A. thaliana* a été retenu pour être étudié.

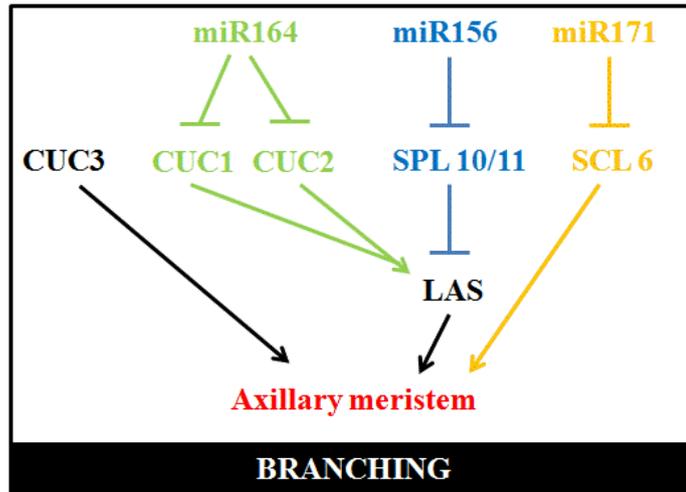


Figure 10 : Implication de miRNAs dans la ramification (Blein et Laufs, 2016)

Les voies représentées en couleur sont directement régulées par les miARNs et leur gènes cibles, les acteurs et flèches représentés en noir ne sont pas directement régulés par les miARNs. Ici, on note l'implication probable de trois miARNs dans la ramification, les miR164, miR156 et miR171. Le premier inhiberait la ramification par répression de l'expression des gènes *CUC1* et *CUC2*, eux-mêmes impliqués dans l'activation de *LAS*, responsable de la ramification chez les plantes. Le miR156 activerait indirectement la ramification par répression de l'expression de gènes *SPL* responsables de l'activation de la transcription du gène *LAS* impliqué dans la ramification. Le miR171 enfin, inhiberait la ramification via la répression de l'expression de *SCL6*, régulateur positif de l'activité des méristèmes axillaires.

3.2. Cinétique de l'élongation du bourgeon sous luminosité faible/forte

On remarque globalement un gradient d'élongation le long de l'axe, l'axe issu du débourrement du bourgeon du sommet (B4) présentant une taille plus importante que B3 à tous les points de cinétique (figure 11 a, b, c et d). Tous les bourgeons présentent une croissance lente entre T0 et T48 (croissance inférieure à 0,3 mm en moyenne) en PAR fort comme en PAR faible. C'est à partir de 48h après décapitation que la croissance accélère fortement et triple (croissance d'un mm en moyenne entre T48 et T96) pour tous les bourgeons et dans les deux conditions de lumière, sauf pour B1 en PAR faible dont la taille augmente de moins de ½ mm. La croissance est ensuite relativement constante (B1 et B3) ou accélère (B2 et B4) pour les quatre bourgeons de T96 à T144 en condition PAR fort, tandis qu'elle s'infléchit pour B1 et B2 en PAR faible. On remarque aussi que les courbes d'élongation de B3 et B4 en PAR fort et PAR faible se superposent presque parfaitement de T0 à T144. Enfin, la longueur moyenne à laquelle les bourgeons débourent est comprise entre 3,5 et 4,5 mm, avec un débourrement s'effectuant en cinétique de l'apex vers la base (figure 12). En PAR fort on note l'apparition de bourgeons débourents à partir de 96h après décapitation pour B4 dans les deux conditions de lumière et uniquement en PAR fort pour B3 (7 % des bourgeons débourents).

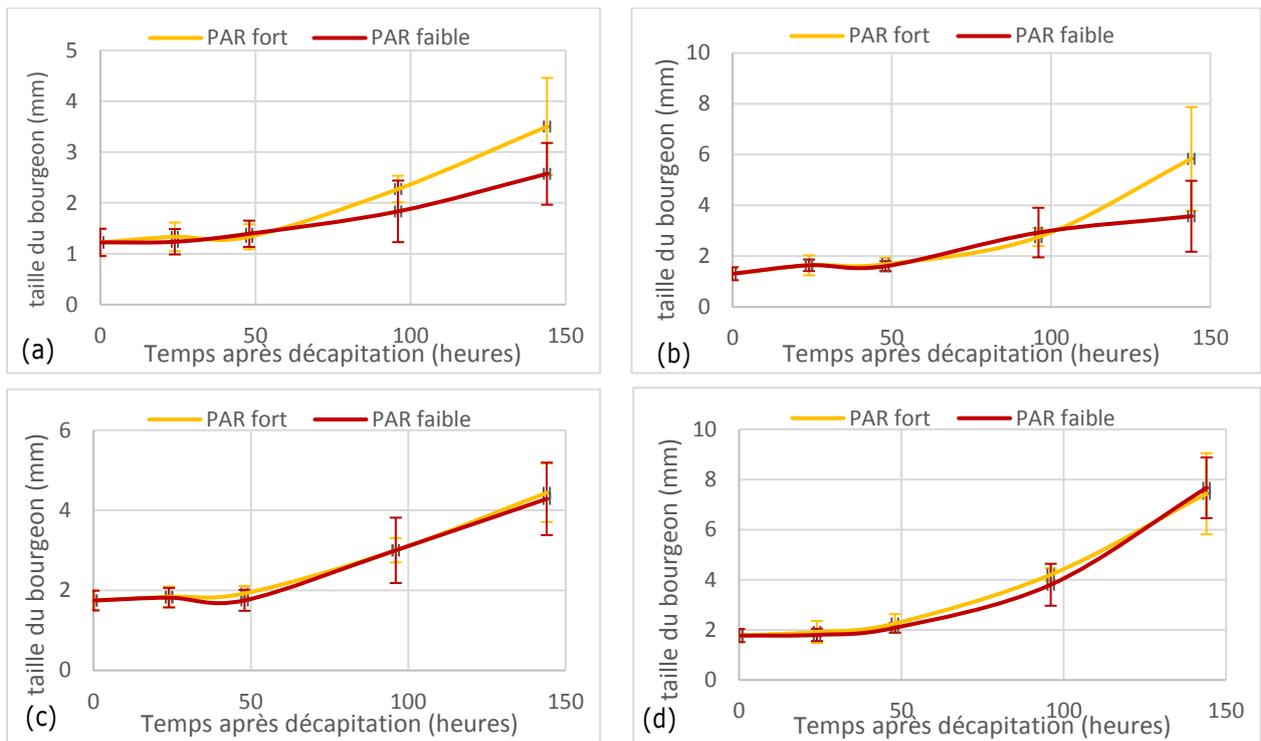


Figure 11 : Cinétique de l'élongation des bourgeons en PAR fort et PAR faible.

Chaque bourgeon est mesuré à T0 puis 24, 48, 96 et 144 heures après décapitation du rosier 3 à 5 individus (3 réplicats biologiques). La courbe d'élongation de B1 est représentée en (a), celle de B2 en (b), de B3 en (c) et de B4 en (d). Les courbes jaunes correspondent à la taille moyenne des bourgeons en PAR fort (350 à $400 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) en fonction du point de mesure et les rouges à celle des bourgeons en PAR faible (80 à $90 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Les barres d'erreurs représentées à chaque point de cinétique correspondent aux écarts-types. 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 bourgeon ni au global entre les deux conditions de lumière ($P > 0,0125$)

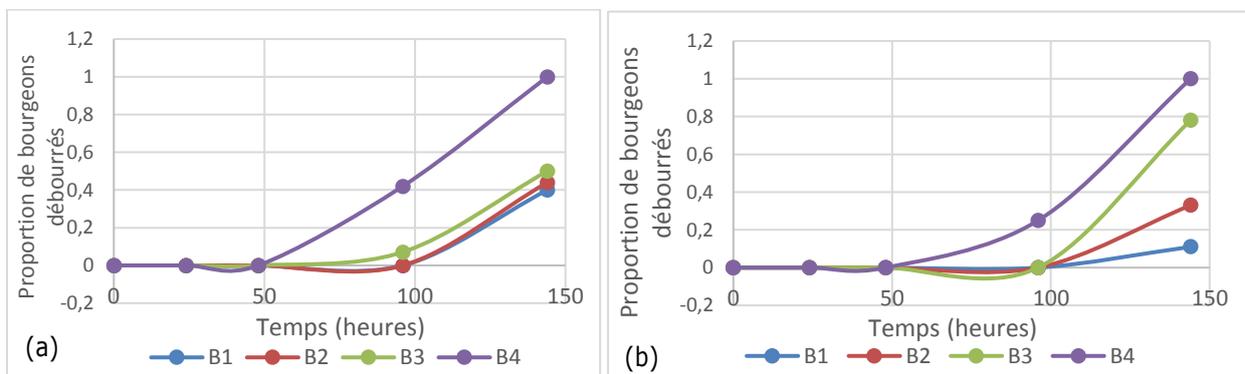


Figure 12 : Cinétique du débourrement des bourgeons en PAR fort (a) et PAR faible (b).

Chaque point représente la proportion de bourgeons débourrés pour B1, B2, B3 ou B4 à un temps donné après décapitation.

3.3. Extraction des ARNs totaux

3.3.1. Vérification qualitative et quantitative ARNs totaux extraits

Nanodrop ;

La vérification qualitative et quantitative des ARNs a donné des résultats très bons concernant les ratios et bon concernant la quantité d'ARN récupérée dans la plupart des cas (Annexe II).

Bioanalyseur ;

Deux échantillons d'ARN donnent, après électrophorèse au bioanalyseur sur puce à ARN totaux, des pics bien définis correspondant aux ARNs de différentes tailles (figure 13). Le RIN (RNA integrity number), un index de qualité des échantillons, est égal à 8.

Migration sur gel d'agarose ;

Le profil de migration sur gel des ARNs extraits (figure 14) présente des bandes nettes, l'absence de smear confirmant que les ARNs obtenus n'ont pas été dégradés au cours du protocole d'extraction. On observe les deux bandes correspondant aux ARNs ribosomiques 18 et 25S et une autre bande ayant plus migré correspondant aux petits ARNs.

3.4. Purification petits ARNs

3.4.1. Vérification qualitative et quantitative ARNs purifiés

Les vérifications de la qualité et de la concentration en miARNs des échantillons purifiés ont été réalisées au Bioanalyseur par électrophorèse sur une puce à miARNs. La figure 15 présente les résultats de l'analyse de l'un des échantillons testés. On peut observer un pic étroit correspondant à l'emplacement du marqueur (à 35 secondes de migration), puis un pic aplati à l'emplacement des miARNs. Cette définition moyenne du pic laisse supposer la possible présence d'ARNs dégradés. L'analyse du graphique montre que l'échantillon contient 90 % de miARNs au total, le tout à une concentration de 1,7 ng/μl. L'indication verte sous le graphique indique qu'il s'agit d'un échantillon de bonne qualité.

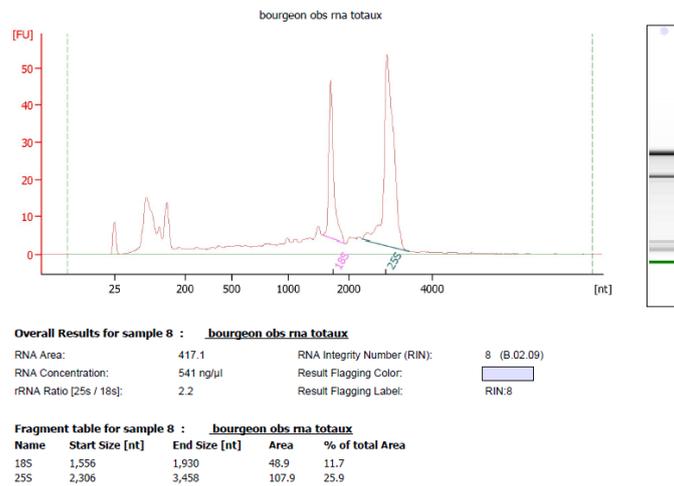


Figure 13 : Résultats d'électrophorèse d'échantillon ARN total au bioanalyseur. Les différents pics du graphe sont fonction de la taille des fragments d'ARN obtenus. Le RIN (RNA integrity number) est un indice calculé selon un algorithme permettant d'estimer l'intégrité de l'échantillon. Un RIN > 8 correspond à un bon échantillon.



Figure 14 : Profils d'électrophorèse de différents échantillons d'ARNs extraits selon le protocole communiqué par François Barbier (échantillons A. Porcher). Les différentes flèches légendent les bandes correspondant aux ARN ribosomiaux (ARNr) 18 et 25S et aux petits ARNs. Une autre désigne le ladder 1kb utilisé sur le gel.

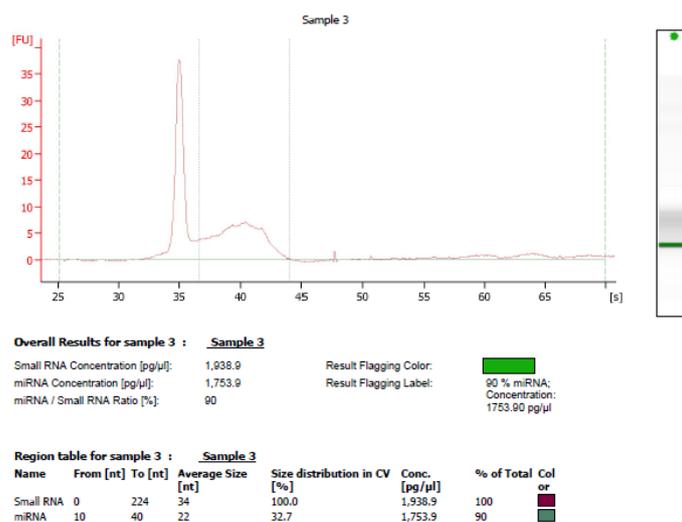


Figure 15 : Résultats graphiques de l'électrophorèse au bioanalyseur de petits ARNs sur une puce à miARNs. Les pics sur le graphe indiquent la présence d'ARNs sortis au bout d'un certain nombre de secondes d'électrophorèse (fonction de la taille du fragment).

3.5. Obtention et test des amorces de RT

3.5.1. Amorces stemloop

Prédiction de la structure

Le corps du primer forme une structure tige-boucle extrêmement stable. En effet, près de 75 % des nucléotides de la séquence présentent une probabilité d'avoir effectivement la conformation indiquée supérieure à 99 % (figure 16 a). L'extrémité 3' de la structure est non appariée pour les 6 derniers nucléotides (nucléotides 45 à 50). C'est cette extrémité qui s'hybridera spécifiquement avec le miARN d'intérêt.

Test qPCR ;

Sur l'échantillon d'ARN totaux, les courbes de dénaturation (=melting curves) obtenues pour U6sn sont homogènes aux dilutions d'ADNc 10, 50 et 100 (RT10, RT50 et RT100) (figure 17 a, b et c), elles ne le sont par contre pas à RT100 pour miR156a (figure 17 d). Leurs températures de dénaturation (=melting temperature) sont homogènes et respectivement de 80 et 82,5°C. Sur échantillon de petits ARNs purifiés, les melting curves sont homogènes pour miR171c, miR156a et U6sn. La melting temperature du miR171c est 81°C. Lorsque l'on calcule les valeurs de delta Ct, on observe une différence importante entre ceux du miR156a par rapport à U6sn dans l'échantillon de tADNc et celui de sADNc (figure 18)

3.5.2. Amorces two-tailed

Prédiction de la structure

La structure obtenue pour les primers two-tailed est la plus stable possible et évaluée de la même façon que les amorces stemloop (figure 16 b).

Test qPCR

L'analyse des résultats de qPCR permet de voir des melting curves bien définies avec des melting temperatures homogènes entre les réplicats techniques. On remarque que les Cq sont globalement plus bas que pour les échantillons traités avec les amorces stemloop. On note aussi l'inhomogénéité des valeurs de Cq des réplicats techniques et l'absence d'effet dose entre les différentes concentrations d'ADNc, ce qui ne permet pas d'analyser plus avant ces résultats.

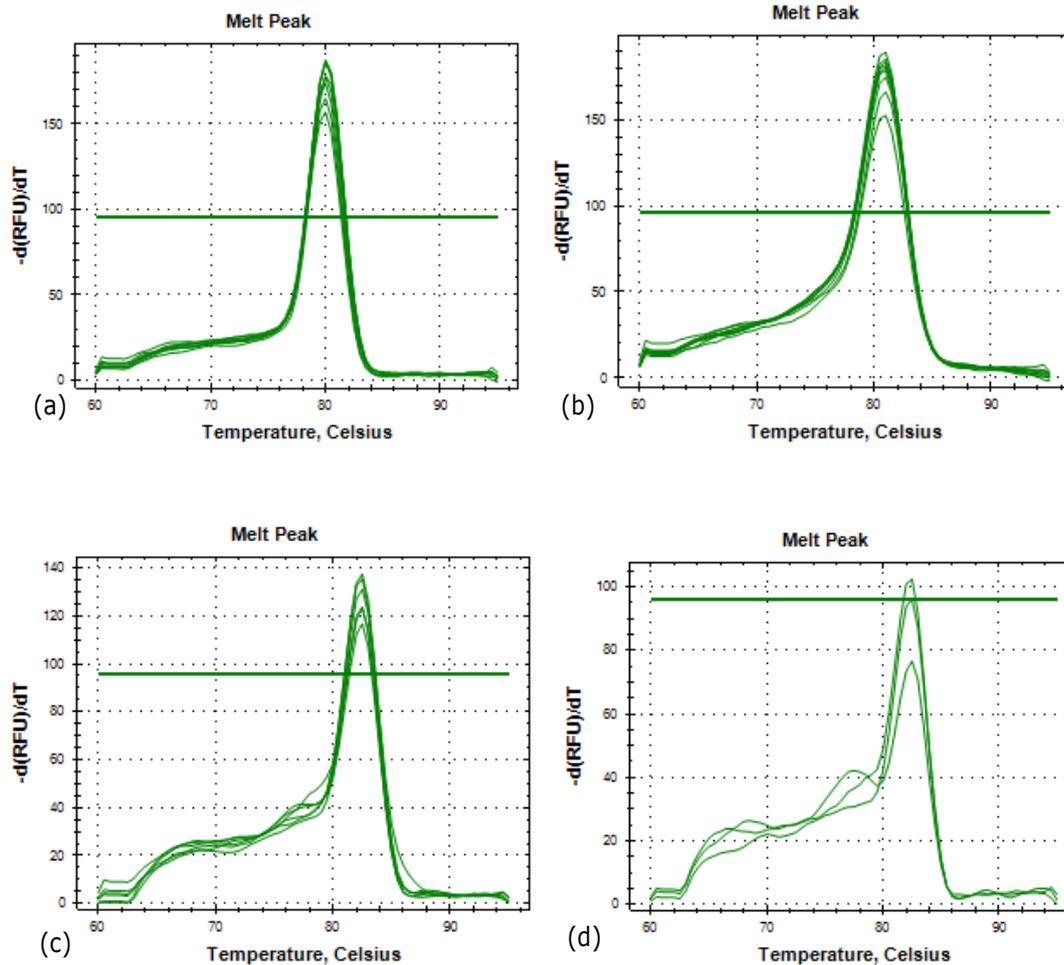


Figure 16 : Melting curves obtenues sur échantillons d'ADNc issus d'ARNs totaux (tADNc) ou d'ARNs purifiés (sADNc), avec différents couples d'amorces. (a) et (b) présentent les courbes de fusion pour U6sn et miR171c respectivement. Elles sont obtenues sur échantillons de tADNc et de sADNc dilués au dixième, au cinquantième ou au centième (RT10, RT50 et RT100). Pour le miR156a on a les courbes de fusion à RT10 et RT50 en (c) et à RT100 en (d).

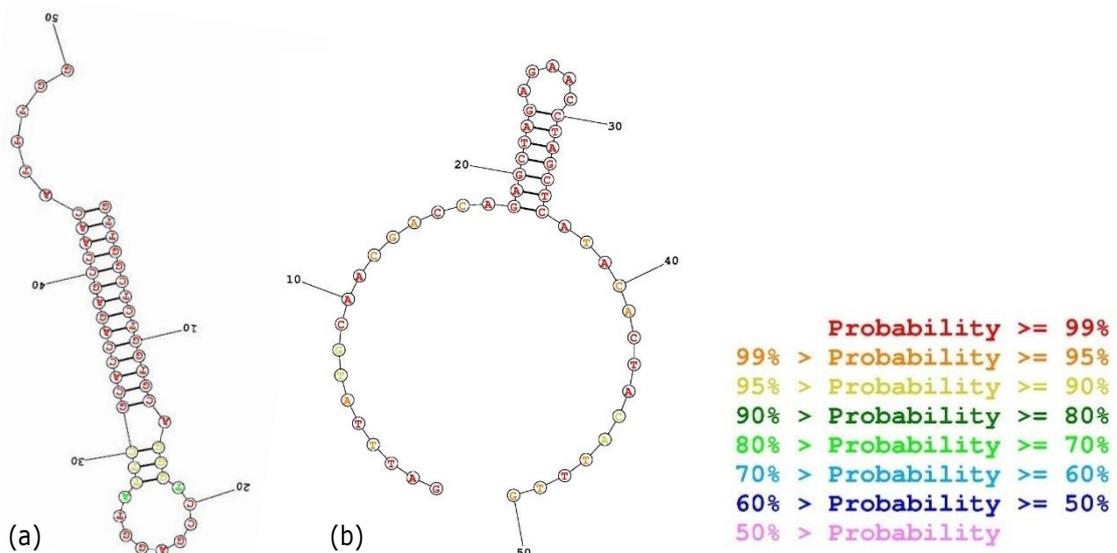


Figure 17 : Structures secondaires probables du primer stemloop (a) et two-tailed (b) pour U6sn calculée par les outils de prédiction de conformation ARN Fold et MaxExpect. L'échelle de couleur indique la probabilité effective de la position prédite dans la structure secondaire pour chaque nucléotide.

3.6. Profil d'expression du précurseur de miR156a et gènes cibles

3.6.1. Cinétique d'expression du prémiR156a dans les bourgeons et les nœuds

Les résultats présentés n'ayant été produits qu'à partir d'un seul échantillon biologique, aucun test statistique n'a été effectué.

Bourgeons

Toutes les courbes de la cinétique d'expression du *prémiR* dans les bourgeons présentent le même aspect, avec néanmoins une symétrie moins remarquable pour B3 (figure 18 b). Dans les bourgeons, on remarque un pic d'expression à 6h dans B1, B2 et B4. L'expression du *prémiR156* par rapport à son expression basale à T0 s'y échelonne de 2,5 à 3,5 environ. On a ensuite globalement un retour au niveau d'expression basal à T24 puis un pic d'expression à T48 pour B2, B3 et B4 (expression multipliée par 3, 7,5 et 5,8 respectivement). Dans le bourgeon 1, après le pic à 6h, on observe une diminution lente et continue d'expression du *prémiR156a* jusqu'à T144. Dans les trois autres bourgeons on remarque une diminution importante et rapide de l'expression du *prémiR* après T48. La cinétique d'expression du *prémiR* dans B3 diffère un peu des trois autres. On retrouve en effet un petit pic d'expression à 3h (1,7) puis une diminution continue jusqu'à 24h (0,27) avant de se rapprocher un peu plus de la tendance d'expression dans les trois autres bourgeons. On note néanmoins une augmentation d'expression plus rapide et plus forte que pour ces derniers. Enfin, si l'expression du *prémiR156a* semble suivre un gradient le long de l'axe (expression décroissante de l'apex vers la base), la cinétique d'expression retrouvée chez B3 s'éloigne là encore de cette observation.

Nœuds

Ici, l'analyse des résultats après la qPCR montre des résultats difficilement exploitables (mauvaise résolution et double-pics des melting curves et Cq élevés) pour tous les nœuds sauf N3. On peut toutefois remarquer une certaine homologie de l'aspect global des courbes entre les couples B1/N1 et B2/N2, avec une cinétique d'expression décalée vers la droite avec un petit pic à 3 heures, décroissance jusqu'à 6h, puis pic à 24h bien marqué pour N2 et faux pic pour N1 (figure 18 a). Les cinétiques d'expression du *prémiR156a* du couple B3/N3 se superposent quant à elles quasiment parfaitement (très léger décalage vers la droite de la cinétique d'expression du prémiR dans N3 avant T24. La cinétique d'expression du *prémiR156a* dans N4 ressemble à celle retrouvée dans B4 sans décalage dans le temps et sans chute d'expression après T48.

3.6.2. Cinétique d'expression de SPL6 dans les bourgeons

Sur la figure 19 on peut superposer les profils d'expression dans B1, B2 et B3, avec une légère chute de l'expression du *prémiR* dès 6h (0,7 pour B1 et B2) et une chute plus importante pour B3 (0,1), l'expression reste ensuite sous la barre des 0,5 jusqu'à T96. Le profil d'expression de *SPL6* dans B4 est différent. On observe un pic d'expression à 6h (2,7) puis elle diminue jusqu'à T24 (environ 1,5). On a ensuite une augmentation d'expression à T96 (environ 3,5).

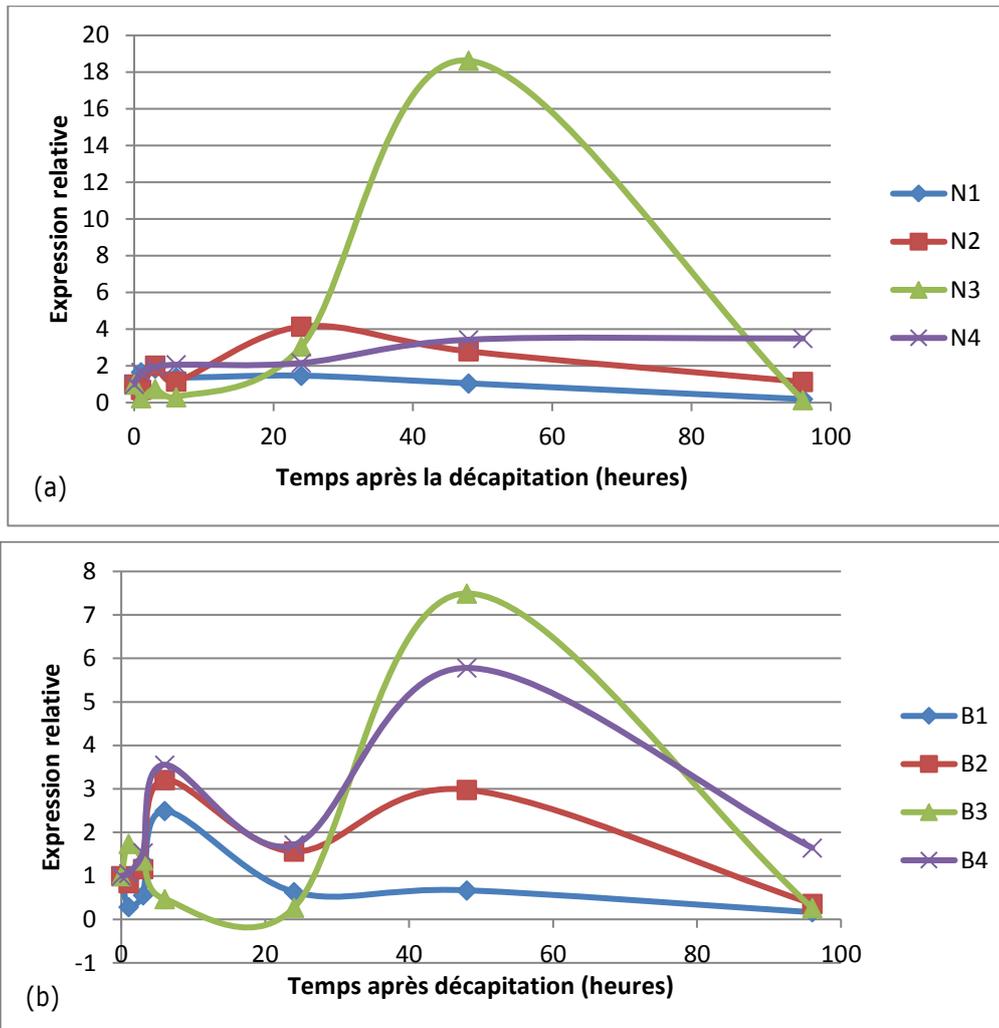


Figure 18 : Cinétique d'expression du *premiR156a* dans les nœuds (a) et les bourgeons (b). Expression du *premiR156a* dans les nœuds (a) ou les bourgeons (b), 24, 48 et 96h après décapitation (0).

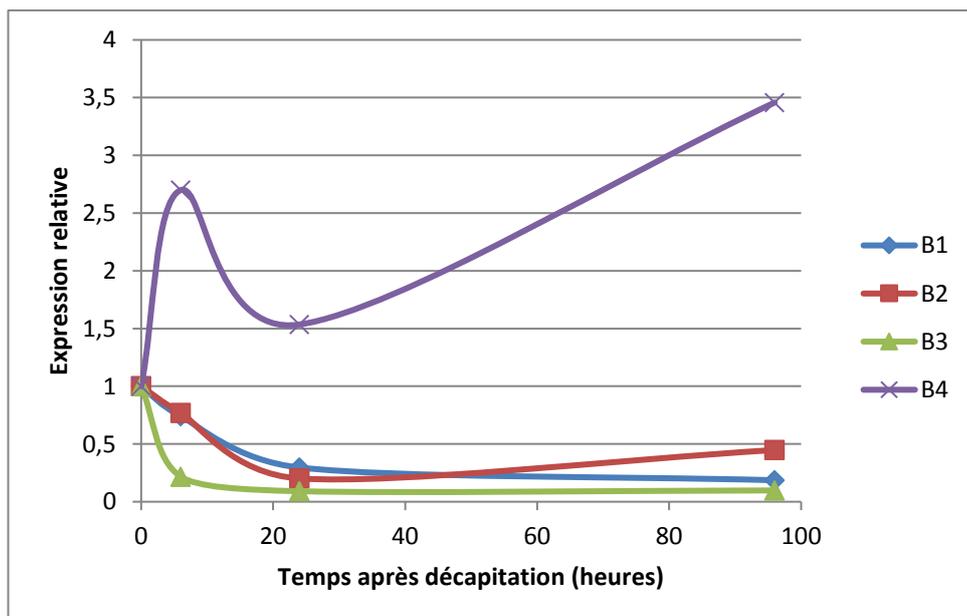


Figure 19 : Cinétique d'expression du gène cible *SPL6* dans les bourgeons. Les courbes représentent l'expression relative de *SPL6* dans les différents bourgeons en fonction du temps après décapitation (0).

4. Discussion

4.1. Un miARN en lien avec la ramification

La cinétique d'expression du prémiR156a observée le long de l'axe dans les bourgeons et les nœuds conforte l'idée d'une implication du miR156a dans le débourrement lié à la levée de la dominance apicale par la décapitation.

Mise en relation de l'expression du prémiR156a et de *SPL6*

On relèvera également la réponse de *SPL6* à la hausse d'expression du *prémiR156a* dès 6h ; on peut émettre l'hypothèse que la hausse d'expression du *prémiR* dans les nœuds entraîne une réponse du gène cible dans les bourgeons en raison d'une accumulation de miR156a. Sachant que ceux-ci ont été décrits comme étant des éléments phloème-mobiles, la migration des *miRs* produits dans les nœuds vers les bourgeons pourrait être une explication. Le maintien de l'expression de *SPL6* à un niveau faible entre T24 et T96 est cohérent avec le pic d'expression ensuite observé dans les bourgeons à T48. Il serait intéressant d'étudier l'expression de *SPL6* entre T24 et T96, à T48 par exemple, pour voir si son expression ne fléchit pas d'avantage. Le profil d'expression particulier de *SPL6* dans N4 pourrait être le fruit de signaux antagonistes, avec possiblement une hausse à 6h expliquée par l'effet de blessure survenant après décapitation. Si celui-ci n'est pas marqué dans les autres nœuds, on peut penser que c'est la proximité de N4 au point de blessure qui explique la différence. En revanche, l'augmentation de l'expression de *SPL6* entre T24 et T96 est plus difficile à expliquer. Elle peut être la résultante d'autres phénomènes de régulation non liés aux miRs et masquant leur effet sur l'expression de *SPL6*. On peut aussi envisager que la suppression d'éventuels miRs provenant de l'apex de la plante (tige et feuilles) par décapitation peut empêcher le maintien de l'expression de *SPL6* à un niveau faible.

Expression du *prémiR* et élongation

Le gradient d'expression du *prémiR156a* dans les bourgeons 1, 2 et 4 pourrait être directement mis en relation avec le gradient d'élongation observé dans ces mêmes bourgeons le long de l'axe. Seul B3 échappe à ce raisonnement. L'aspect de la cinétique d'expression du *prémiR* dans ce bourgeon faisant plus penser à celle observée dans les nœuds, on peut émettre plusieurs hypothèses. La première serait que l'un des bourgeons prélevés l'ait été avec un fragment de nœud. Du fait du petit nombre de bourgeons dans l'échantillon (cinq) et de l'absence de réplicats biologiques, on pourrait alors observer un étirement de la courbe vers le haut (expression du *prémiR* possiblement beaucoup plus élevée dans les nœuds que les bourgeons). Néanmoins, cette explication ne permet pas d'élucider l'aspect de la courbe de cinétique d'expression dans N3. La seconde explication serait que l'expression du *prémiR* est différente dans le couple N3/B3. Il est nécessaire de refaire le test sur d'autres échantillons biologiques pour pouvoir répondre à ces interrogations.

miRs et lumière

Comme mentionné précédemment, le maintien de *SPL6* à un faible niveau d'expression après le pic d'expression du *prémiR* à T48 (observé dans les bourgeons), pourrait résulter de la régulation continue par les miRs matures provenant d'autres organes comme la tige, les feuilles ou les racines. La feuille en particulier, lieu de perception de la lumière tout comme l'est le bourgeon, pourrait produire des miRs ensuite transportés vers les bourgeons. Dans une étude de 2016, les auteurs ont mis en évidence l'impact de la lumière bleue sur l'expression du *miR167* qui lui-même médiait la régulation positive de l'expression de gènes de la famille des *auxin response factors* (Pashkovskiy *et al.*, 2016), impliqués dans le développement (Huang *et al.*, 2017). Les miR171 et 156 sont tous deux impliqués dans des voies de signalisation liées à l'auxine ou à d'autres hormones, et il serait intéressant de tester leur réponse à la lumière dans un protocole plus simple et rapide que celui mis en place qui a pour vocation de répondre à une question très précise, mettant en lien trois choses, les miRs, le débourrement et la lumière.

4.2. Pertinence des techniques utilisées pour l'amplification des miARNs matures

4.2.1. L'isolement des petits ARNs

Bien que les auteurs à l'origine de la technique de RT stemloop aient rapporté une bonne spécificité de leurs amorces de rétrotranscription pour les miARNs matures, la dénaturation préalable des ARNs avant la RT semblait problématique (Varkonyi-Gasic and Hellens, 2011). En effet les pri et prémiRs contiennent tous deux la séquence du miARN mature et si leur structure secondaire ne permet pas, à température ambiante, leur hybridation à l'amorce de stemloop, la dénaturation des ARNs en début de protocole de RT faisait apparaître un risque, au moins théorique, d'appariements non spécifiques. Le test des amorces de RT stemloop sur un échantillon d'ARN totaux et sur un échantillon de petits ARNs purifiés issus de celui-ci devait ainsi permettre de comparer la technique sur échantillon purifié/ échantillon total pour voir si on obtenait des résultats de spécificité divergents. Les résultats ont permis de constater qu'en dehors d'une concentration en miARNs permettant d'obtenir des valeurs de Cq plus basses par rapport à la technique de qPCR couramment utilisée (moyenne de 25,08 contre 28,67 Cq, figure 20). Aucun gain de spécificité n'est observé (pas d'irrégularités au niveau des melting curves pouvant évoquer des hybridations aspécifiques). Il semble ainsi que s'ils existent, ces appariements indésirables sont négligeables. C'est pour cette raison qu'une purification des petits ARNs ne paraît pas particulièrement pertinente car non justifiée et coûteuse en matériel biologique, en consommables et en temps. Enfin les résultats présentés figure 21 mettent en évidence un changement important dans la composition en ARNs après purification. Les copies de U6sn semblent en effet avoir été partiellement perdues ou dégradées au cours de la purification.

4.2.2. L'extraction sans kit d'ARNs totaux

Les résultats obtenus en termes de qualité et de quantité des ARNs extraits sont très prometteurs. Bien que le protocole soit relativement coûteux en temps (environ une journée pour l'extraction d'une trentaine d'échantillons, avec nécessité d'être deux pour certaines étapes délicates), il permet un gain très important

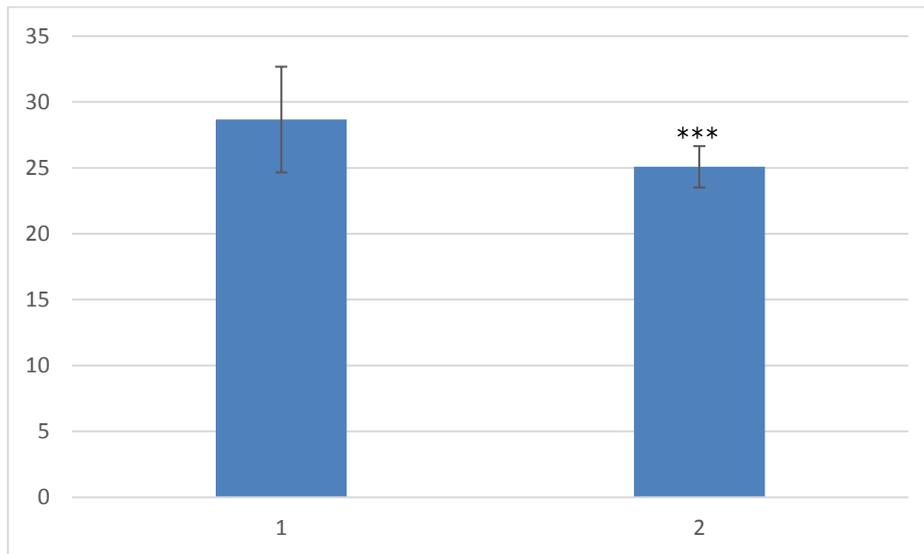


Figure 20 : valeurs moyennes de Cq dans les échantillons d'ADNc totaux (1) ou purifiés (2). On remarque qu'avec les mêmes couples d'amorces qPCR et le même échantillon total ou purifié obtenu à partir de la même quantité d'ARNs avant RT, on obtient une valeur de Cq moyenne inférieure dans les échantillons de sADNc à celle retrouvée dans les échantillons de tADNc. Sont indiqués les écarts types. *** un test de Student met en évidence une différence statistiquement significative entre les deux échantillons (P=0,0013)

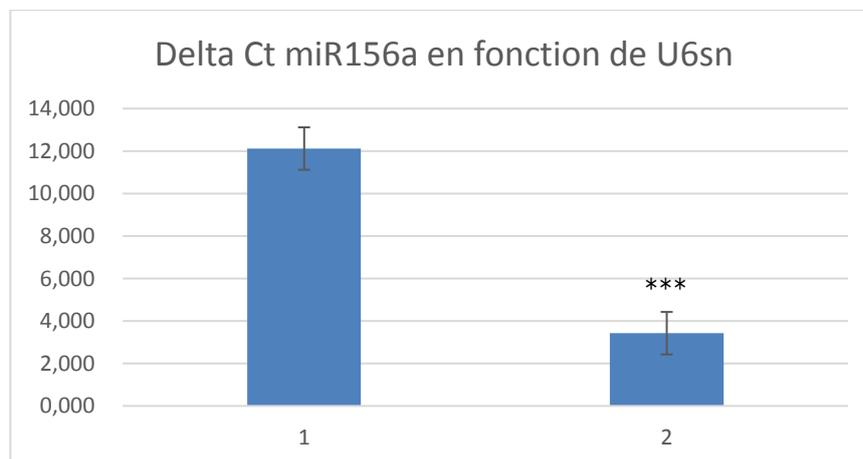


Figure 21 : Niveau d'expression du *miR156a* dans les échantillons de tADNc (1) et sADNc (2) Le delta Ct donne une indication sur le niveau d'expression d'un gène dans un échantillon par rapport à un contrôle interne (ici U6sn, soit Cq *miR156a* - Cq U6sn), plus la valeur est faible et plus le niveau d'expression est important. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types. *** Statistiquement significatif (test de Student, P<0,01).

de quantité de matériel biologique à prélever. Certains kits commerciaux nécessitent ainsi une centaine de bourgeons pour l'extraction d'une quantité suffisante d'ARN, quand il n'en faut que 5 à 10 avec ce protocole. Il est également adapté à l'extraction d'ARNs sur matériel végétal difficile, contenant par exemple beaucoup de polyphénols ou de pigments puisqu'il a été testé avec succès sur des plantes comme le cacaoier ou d'autres ligneux. Le problème de la faible concentration en ARNs de certains échantillons pourrait être réglé en augmentant par deux ou trois les quantités de bourgeons à prélever aux points de cinétiques les plus précoces (T24 mais surtout T0). De même, les ratios de pureté des échantillons, parfois faibles, semblent n'être qu'un biais lié à la technique. Avec la pratique, les ratios devraient s'homogénéiser et tendre vers des valeurs plus hautes. L'indice RIN des échantillons (=8) passés au bioanalyseur les classe dans les « bons » échantillons. Pour résumer, ce protocole est très qualitatif et permet un gain net de temps et d'argent.

4.2.3. Comparaison des techniques de RT stemloop et two-tailed

Bien que la préparation des amorces de two-tailed soit plus contraignante que celle des amorces de stemloop, le protocole de RT est en soit plus simple et plus fiable pour la technique du two-tailed. On n'a en effet pas d'étape préalable de dénaturation de l'ARN pour cette dernière et l'ensemble du protocole est réalisé à température ambiante jusqu'à l'arrêt de la réaction à 95°C. Le risque de rétrotranscrire des primiRs ou prémiRs est ainsi évité, et bien que la technique du stemloop semble suffisamment spécifique, il s'agit d'une garantie supplémentaire bienvenue. Pour une même quantité d'ARN mise en réaction, les niveaux d'expression observés à la qPCR sur les ADNc produits par la technique du two-tailed sont plus élevés que ceux observés pour la technique du stemloop ; cela suggérerait que nous pouvons obtenir une plus grande efficacité de la RT par la technique de two-tailed. L'absence d'effet de la concentration des ARNs sur les niveaux d'expression pour les échantillons obtenus par la technique de two-tailed semblent indiquer que les amorces qPCR étaient limitantes dans le mix. Une augmentation de la quantité d'amorces ou de la dilution des échantillons à tester sont deux pistes à envisager pour régler le problème. Cet aspect n'est pas observé avec les échantillons obtenus par la technique du stemloop, mettant à nouveau en avant le fait que la rétrotranscription n'est probablement pas aussi efficace avec cette technique (ADNc obtenus moins concentrés). Ces résultats restent à confirmer par la réalisation de triplicats biologiques et de duplicats techniques pour chaque échantillon biologique, de façon à vérifier la reproductibilité statistique des deux techniques et choisir effectivement celle des deux qui semble la plus prometteuse. D'un point de vue économique, la réalisation possible d'une RT multiplexe avec la technique du two-tailed (Androvic *et al.*, 2017) permet un gain de temps et de réactifs non négligeable, avec de très bons résultats documentés par les auteurs à l'origine de la technique. Bien que la technique de RT stemloop décrite par Varkonyi-Gassic et Hellens (2011) ne fasse pas état de la possibilité d'une RT en multiplexe, la recherche d'un protocole la décrivant pourrait être intéressante. Une autre alternative pourrait être une adaptation du protocole de RT multiplexe de la technique du two-tailed à la technique du stemloop. Une des limites à ces deux techniques est l'impossibilité d'obtenir l'intégralité des miARNs rétrotranscrits dans un échantillon, ce qui limite leurs utilisations possibles à l'étude d'expression de miARNs candidats pré-sélectionnés (pas d'approche sans *a priori*). Ils sont donc d'excellents outils à envisager lorsque l'on a identifié les miARNs d'intérêt et que l'on

souhaite les isoler pour étudier leur expression. On peut aussi penser à leur utilisation en recherche fondamentale si l'on souhaite étudier les rôles biologiques d'un miARN en particulier sans rien connaître de ses implications.

4.3. Difficultés rencontrées

4.3.1. Matériel végétal et maladie

Les rosiers sur lesquels j'ai travaillé au cours de mon stage présentaient un phénotype nain, présentant peu de phytomères avec des entre-nœuds courts voire très courts. Ce phénotype est problématique en soi car il peut être le signe d'une réponse à un stress. Par ailleurs, les individus d'un même lot étaient parfois inhomogènes en termes de vigueur ou d'aspect général. La fréquence des individus ayant des phénotypes anormaux a par ailleurs été un problème car cela a nécessité de les écarter de l'expérimentation, réduisant de ce fait le nombre de plantes disponibles.

Une grande partie des plantes présentaient des symptômes de piqûres dues au thrips. Elles auraient en principe dû être écartées, car le risque d'observer des réactions de défense est important. Ces réactions peuvent interférer avec les résultats obtenus, rendant leur analyse difficile.

4.3.2. Résultats de phénotypage non significatifs

Chez le rosier, le débourrement étant sous l'influence de la lumière, un impact sur la cinétique d'élongation et de débourrement des bourgeons était en principe ce que l'on s'attendait à voir. Or, aucun des résultats obtenus ne diffère significativement entre les conditions de luminosité PAR fort et PAR faible. Les très grands écarts-types, retrouvés notamment à partir de T96 peuvent être en partie mis en cause, avec parfois des moyennes ayant été faites sur les données d'élongation de moins de 7 individus. Le faible nombre d'individus dans les réplicats pose donc aussi problème. Ces mesures devraient être reconduites en ne sélectionnant par exemple que B3/N3 ou B4/N4, qui semblent présenter les résultats les plus significatifs, à la fois en termes d'élongation et si on recoupe ces données avec l'ensemble des résultats d'expression obtenus dans les nœuds et bourgeons, à la fois pour le prémiR15-a et le gène cible *SPL6*. On note en particulier le pic d'expression du prémiR156a à T48 en PAR fort, ce qui pourrait être mis en lien avec l'accélération de la croissance de l'ensemble des bourgeons à ce même stade. On pourrait envisager que le pic d'expression soit proportionnel à la rapidité à laquelle le bourgeon va atteindre le stade du débourrement. On peut penser à un effet dose. En effet, si les bourgeons sont au départ presque tous de la même taille, on note à partir de T48 puis de plus en plus visiblement l'écart de croissance entre les bourgeons selon un gradient sur l'axe. Il serait sûrement intéressant de pousser l'analyse phénotypique plus avant en resserrant la cinétique de départ et en l'étendant encore plus loin que 144h après décapitation. À ce stade les bourgeons n'ont en effet pas encore tous débourré. Néanmoins, une restriction de l'analyse aux bourgeons présentant l'expression du miR156 la plus élevée pourrait aussi être une piste. Cela pourrait éventuellement permettre de gagner du temps mais se ferait au risque d'une perte d'information.

Par soucis de rigueur, et voyant les écarts-types sur les échantillons ayant servi au phénotypage (élongation des bourgeons), il serait peut-être judicieux de ne s'en servir que pour réaliser des tests. La reprise du

protocole avec un nombre suffisant d'individus sains serait souhaitable pour partir sur de bonnes bases pour étudier les profils d'expression des *prémiRs*, *miRs* et leurs gènes cibles.

5. Conclusions et perspectives

5.1. Conclusion

On retiendra ici la visible réponse du prémiR156a suite à la levée de la dominance apicale par décapitation. Il est intéressant de s'attarder sur les pics d'expression du *prémiR* survenant au même moment que l'accélération de l'élongation du bourgeon (figures 11 et 18 b) à T48. Les résultats obtenus chez le rosier peuvent être mis en parallèle de ceux recensés chez d'autres espèces comme *A. thaliana* (Blein and Laufs, 2016). Le test de la réponse de *miR156a* à la levée de dominance apicale en PAR faible permettra éventuellement de mettre en évidence une différence par rapport à la condition de lumière PAR fort. Le lien entre l'expression du gène cible *SPL6* et l'expression du *miR* mature reste encore à tester pour pouvoir envisager un lien entre ce gène et le débourrement. Bien que ces informations préliminaires doivent être pondérées et prises avec circonspection, la piste de l'implication des miARNs dans le débourrement semble particulièrement prometteuse. L'affinement du travail de recherche vers des organes, des points de cinétique et des conditions environnementales plus précises permettra d'obtenir des résultats d'avantage informatifs que ceux recueillis au cours de ce stage. Les techniques testées pour étudier l'expression à la fois des *prémiRs*, des *miRs* et de leurs gènes cible ont donné des résultats probants, et leur utilisation et leur perfectionnement permettront une étude rigoureuse et sensible de ces éléments. On aura notamment la possibilité d'étudier des *miRs* avec des séquences très proches les unes des autres pour affiner les schémas d'implication des uns et des autres dans les différentes voies de signalisation médiant le débourrement.

5.2. Perspectives

La recherche des miARNs impliqués dans le débourrement par une approche sans *a priori* semble souhaitable pour identifier de façon relativement exhaustive les acteurs de cette phase essentielle du développement et de l'architecture des plantes. La mise en évidence d'un micro-transcriptome du débourrement chez le rosier permettrait de travailler directement à l'identification des miARNs les plus différentiellement exprimés lors de la signalisation du débourrement. La recherche peut également être affinée en ne s'intéressant qu'à la signalisation du débourrement médiée par la lumière. Le *miR171c* est néanmoins un candidat très solide, car décrit avec son gène cible *SCL6* comme étant impliqué dans la ramification au travers de la régulation de gènes répondant à AUX et à GA (Huang *et al.*, 2017). L'étude de son expression apparaît être une bonne piste de travail. Les miPEPs (micropeptides), méritent toute l'attention car ils pourraient ouvrir de nouvelles portes vers une gestion plus durable et simple de l'architecture globale de la plante (Lauressergues *et al.*, 2015). Ceux-ci pourraient donc être utilisés pour stimuler la production de miARNs par la plante quand cela s'avère être agronomiquement intéressant, comme par exemple la stimulation de la production de *miR172c* par supplémentation de l'eau d'arrosage en *miPEP172c* chez le colza. Cela favoriserait la formation de nodules racinaires chez cette plante et améliorerait donc sa capacité à tirer profit de l'azote atmosphérique (Couzigou *et al.*, 2016). On peut également envisager la création de miARNs synthétiques pour réguler l'expression de certains gènes cibles.

Cela peut à la fois faire l'objet de transformation génétique de la plante (Faisal *et al.*, 2017) ou bien être une piste de réflexion concernant l'application exogène de miARNs à la plante comme on l'a fait avec les miPEPs. Dans le volet de la régulation négative des miARNs, on peut également penser aux anti-miARNs s'appariant aux miARNs et les empêchant par compétition de se fixer sur leurs transcrits-cibles. De cette façon, on disposerait de deux leviers de régulation post-transcriptionnelle, un favorisant l'expression des *miRs* et l'autre la freinant.

6. Bibliographie

- Androvic P, Valihrach L, Elling J, Sjoback R, Kubista M.** 2017. Two-tailed RT-qPCR: a novel method for highly accurate miRNA quantification. *Nucleic Acids Research* **45**, e144–e144.
- Bari A, Orazova S, Ivashchenko A.** 2013. miR156- and miR171-Binding Sites in the Protein-Coding Sequences of Several Plant Genes. *BioMed Research International* **2013**.
- Bertoli G, Cava C, Castiglioni I.** 2015. MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. *Theranostics* **5**, 1122–1143.
- Blein T, Laufs P.** 2016. MicroRNAs (miRNAs) and Plant Development. In *eLS*, John Wiley & Sons, Ltd (Ed.).
- Budak H, Akpınar BA.** 2015. Plant miRNAs: biogenesis, organization and origins. *Functional & Integrative Genomics* **15**, 523–531.
- Couzigou J-M, André O, Guillotin B, Alexandre M, Combier J-P.** 2016. Use of microRNA-encoded peptide miPEP172c to stimulate nodulation in soybean. *New Phytologist* **211**, 379–381.
- Faisal A-RM, Biswas S, Zerín T, Rahman T, Seraj ZI.** 2017. Downregulation of the DST Transcription Factor Using Artificial microRNA to Increase Yield, Salt and Drought Tolerance in Rice. *American Journal of Plant Sciences* **08**, 2219–2237.
- Girault T, Bergougnoux V, Combes D, Viemont J-D, Leduc N.** 2008. Light controls shoot meristem organogenic activity and leaf primordia growth during bud burst in *Rosa* sp. *Plant, Cell & Environment* **31**, 1534–1544.
- Horvath D.** 2010. Bud Dormancy and Growth. In: Pua EC,, In: Davey MR, eds. *Plant Developmental Biology - Biotechnological Perspectives*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 53–70.
- Huang W, Peng S, Xian Z, Lin D, Hu G, Yang L, Ren M, Li Z.** 2017. Overexpression of a tomato miR171 target gene SIGRAS24 impacts multiple agronomical traits via regulating gibberellin and auxin homeostasis. *Plant Biotechnology Journal* **15**, 472–488.
- Huijser P, Schmid M.** 2011. The control of developmental phase transitions in plants. *Development* **138**, 4117–4129.
- Lang GA, Early JD, Martin GC, Darnell RL.** 1987. Endodormancy, Paradormancy, and Ecodormancy—Physiological Terminology and Classification for Dormancy Research. *HortScience* **22**, 371–377.
- Lauressergues D, Couzigou J-M, Clemente HS, Martinez Y, Dunand C, Bécard G, Combier J-P.** 2015. Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides. *Nature* **520**, 90–93.
- Leduc N, Roman H, Barbier F, Péron T, Huché-Théliér L, Lothier J, Demotes-Mainard S, Sakr S.** 2014. Light Signaling in Bud Outgrowth and Branching in Plants. *Plants* **3**, 223–250.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V.** 1993. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*.
- Li L-J, Leng R-X, Fan Y-G, Pan H-F, Ye D-Q.** 2017. Translation of noncoding RNAs: Focus on lncRNAs, pri-miRNAs, and circRNAs. *Experimental Cell Research* **361**, 1–8.
- Li C, Zhang B.** 2016. MicroRNAs in Control of Plant Development: MicroRNAs AND PLANT DEVELOPMENT. *Journal of Cellular Physiology* **231**, 303–313.
- Pashkovskiy PP, Kartashov AV, Zlobin IE, Pogosyan SI, Kuznetsov VV.** 2016. Blue light alters miR167 expression and microRNA-targeted auxin response factor genes in *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **104**, 146–154.

Varkonyi-Gasic E, Hellens RP. 2011. Quantitative Stem-Loop RT-PCR for Detection of MicroRNAs. In: Kodama H,, In: Komamine A, eds. RNAi and Plant Gene Function Analysis. Totowa, NJ: Humana Press, 145–157.

Wang L, Mai Y-X, Zhang Y-C, Luo Q, Yang H-Q. 2010. MicroRNA171c-Targeted SCL6-II, SCL6-III, and SCL6-IV Genes Regulate Shoot Branching in Arabidopsis. *Molecular Plant* **3**, 794–806.

Yu Y, Jia T, Chen X. 2017. The 'how' and 'where' of plant microRNAs. *New Phytologist* **216**, 1002–1017.

RÉSUMÉ

Les miARNs (microARNs) sont de petites molécules endogènes intervenant dans la régulation post-transcriptionnelle d'un grand nombre de gènes. Ces miARNs sont impliqués dans des processus biologiques variés et peuvent notamment intervenir dans le contrôle du développement des plantes, en particulier le débourrement. Chez le rosier, celui-ci est très dépendant des conditions lumineuses. Les miARNs miR156a et miR171c ont été de nombreuses fois cités comme étant impliqués dans la ramification, notamment chez *Arabidopsis thaliana*. Les résultats ici obtenus sur miR156a tendent à corroborer cela également chez le rosier et permettent d'envisager de prolonger l'expérimentation plus avant de façon à confirmer la tendance observée.

Il est donc intéressant de regarder quels rôles peuvent avoir ces microARNs dans le photocontrôle du débourrement. Cela permettrait de déterminer les voies de signalisation impliquées dans le phénomène et, à terme, grâce au développement des connaissances et techniques liées aux micropeptides, de petits régulateurs positifs de la production de miARNs, de pouvoir envisager la maîtrise de l'architecture des plantes par les horticulteurs. Cette porte ouverte sur une façon d'envisager l'horticulture plus écologique et plus efficace s'inscrit dans une dynamique très actuelle de respect de l'environnement à toutes les échelles.

mots-clés : rosier, miARNs, ramification, débourrement, lumière

ABSTRACT

miRNAs are small endogenous molecules taking part in numerous genes' post-transcriptional regulation. Those miRNAs are implicated in various biological process including the control of plant development, and especially budbreak. In rosebush, this is under control of light conditions. miRNAs miR156a and miR171c have been cited numerous times as implicated in branching, especially in *Arabidopsis thaliana*. Results here obtained with premiR156a expression study are consistent with other findings. We can then think about keep on working on it to confirm our preliminary results. It could be interesting to elucidate those miRNA roles in budbreak photocontrol. This would permit us to determine molecular signaling pathways involved in this phenomenon. Micropeptides are small positive regulator of miRNA biogenesis and thanks to miPEP-linked knowledge and techniques, we could eventually think about plants' architecture control by in horticulture. This will open doors to consider a more efficient and eco-friendly horticulture, which is a very current issue in order to respect the environment.

keywords : rosebush, miRNA, branching, budbreak, light

ANNEXES

Annexe I : séquences de l'ensemble des primers qPCR et de RT utilisés

Les suffixes Fwd ou F sont ajoutés aux amorces qPCR sens et Rev ou R aux amorces antisens, ils sont précédés de sl pour stemloop, de tt pour two-tailed et sans précision pour les amorces classique. Les amorces de RT contiennent l'indication stemloop ou two-tailed. L'universal reverse primer est celui qui sert de primer reverse à toutes les qPCR sur ADNc issus d'une RT stemloop.

SCL6Fwd	AGGAGGCTTTGCAACTCCTC
SCL6Rev	TGACATCAAAAGGGGTCTGGG
mir171cslFwd	GCGGCGGTGATTGAGCCGCGCC
mir171cstemloop	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACGATATT
premir171cFwd	CGAAAGCGATGTTGGTGAGG
premir171cRev	GATATTGGCGCGGCTCAATC
miR171c two-tailed	CAATATCCAACGACCAGAGCTAGAGAACCTAGCTCACCCACTACGATTGA
mir171cttFwd	GCAATATCCAACGACCAGAGCTA
mir171cttRev	CGCGAGATATTGGTGCGGT
Universal reverse primer	GTGCAGGGTCCGAGGT
UBC F	GCCAGAGATTGCCATATGTA
UBC R	TCACAGAGTCTAGCAGCACA
UBC two-tailed	CACCCCATCCTTCTCTCCAGGTACAGTTGGTACCTGTCCACTTACCACC
UBCttFwd	CACCCCATCCTTCTCTCCAG
UBCttRev	GGCGATGGGGTGCATCTG
U6sn two-tailed	GATTTATGCAACGACCAGAGCTAGAGAACCTAGCTCATACACTACATTTG
U6snttFwd	CGATTTATGCAACGACCAGAGC
U6snttRev	CGGGCATAAATCGAGAAATGGT
U6sn stemloop	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACATTTGG
U6snslFwd	CGGGCATAAATCGAGAAATGGT
Universal reverse primer	GTGCAGGGTCCGAGGT
SPL6Fwd	CCTACCAGGGTGCTCTCTCT
SPL6Rev	ATTTGCAGAGGGGTAGCCAC
SPL13AFwd	CATGGAGCTTCTGTCTGCCA
SPL13ARev	CTCTTTTCAGACGCAGCAGC
mir156aslFwd	GCGGCGGTGACAGAAGAGAGT
mir156a stemloop	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACGTGCTC
premir156aFwd	GTGAGCACACAGAGGCAGAT
premir156aRev	AGAAATGAGCACGCAAAAGCA
Universal reverse primer	GTGCAGGGTCCGAGGT
miR156a two-tailed	CTCTCTTC CTATGCTCTCCAGGTACAGTTGGTACCTGTCTCCACTTGTGC
miR156attFwd	GGCTCTTCTCTATGCTCTCC
miR156attRev	GGCGCTGACAGAAGAGAG

Annexe II : Récapitulatif de quantification et ratios de pureté des échantillons ARN

Dosage de la concentration en ARN des différents échantillons en ng/µl. les échantillons portant un « L » dans leur dénomination sont ceux provenant de condition de lumière PAR fort, les autres provenant de PAR faible. Les ratios 260/280 et 260/230 indiquent la pureté des échantillons vis-à-vis des protéines et des polyphénols respectivement. Les ratios en vert foncé sont très bons, en vert clair ils sont bons, en orange ils sont moyens et en rouge ils sont mauvais. Les échantillons entourés en rouge nécessiteront peut-être d'être reprélevés.

Sample ID	ng/ul	260/280	260/230
Blanc	0.00	NaN	NaN
TOB1 1	22.45	1.98	1.11
TOB2 1	19.87	1.91	2.33
TOB3 1	20.04	2.15	1.92
TOB4 1	86.67	1.86	1.54
T24B1 1	56.74	1.85	1.40
T24B2 1	81.31	2.04	1.90
T24B3 1	9.31	1.63	1.19
T24B4 1	37.61	1.72	1.16
T24LB1 1	80.95	1.85	1.38
T24LB2 1	69.18	2.08	1.85
T24LB3 1	99.72	1.96	1.62
T24LB4 1	104.59	1.89	1.79
T96B1 1	352.10	1.99	1.56
T96B2 1	194.02	1.78	1.23
T96B3 1	1035.31	1.67	1.20
T96B4 1	1247.08	2.06	1.60
T96LB1 1	281.14	1.98	1.79
T96LB2 1	379.58	2.18	2.04
T96LB3 1	546.31	2.18	1.99
T96LB4 1	633.83	2.14	1.93
TOB1 2	15.50	1.62	1.00
TOB2 2	15.73	1.68	1.30
TOB3 2	52.21	1.86	1.38
TOB4 2	44.15	1.69	1.00
TOB1 3	54.42	1.80	1.25
TOB2 3	16.44	2.31	2.06
TOB3 3	155.23	2.14	2.02
TOB4 3	80.17	2.02	1.87
T24LB1 2	17.52	1.78	1.06
T24LB2 2	38.76	1.77	1.26