



université
de BORDEAUX

bic
Bordeaux Imaging Center



IBISA
INFRASTRUCTURES
BIOLOGIE SANTÉ
ET AGRICULTURE



Ctifl



**Dans le cadre de la formation de L'université de Bourgogne
UFR des Sciences de la Vie, de la Terre et de l'Environnement**

Master Sciences, Technologies, Santé

Mention Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité Biologie Intégrative des Interactions Plantes Microbes Environnement

Parcours Professionnel Plante Production Biotechnologie,

Soutenance le 11/12 septembre 2017

Par : Diane Bonnet

Etude des dépôts de callose dans les bourgeons de cerisier au cours de la dormance

INRA Centre de Bordeaux

UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie

L'équipe Adaptation du Cerisier au Changement Climatique

Sous la direction de : Bénédicte Wenden, chargée de recherche
Patricia Gerbeau-Pissot, enseignant chercheur

Année universitaire : 2016-2017



DECLARATIONS

Par la présente, je soussignée Diane Bonnet, certifie avoir rédigé mon mémoire de stage intitulé :

Etude des dépôts de callose dans les bourgeons de cerisier au cours de la dormance.

Seule et sans aucune aide interdite. Je ne me suis basée sur aucune autre source que celles mentionnées et citées dans le manuscrit. Ce mémoire n'a ni dans sa forme actuelle, ni dans une forme proche, été soumis à une autre institution.

Lieu, Date et Signature

Par la présente, je soussignée Bénédicte Wenden Maître de stage de Diane Bonnet certifie avoir lu le manuscrit intitulé :

Etude des dépôts de callose dans les bourgeons de cerisier au cours de la dormance.

et être en accord avec son contenu.

Lieu, Date Signature

Villeneuve d'Ornon

le 28/08/2017



Liste des abréviations

A3C : Adaptation du Cerisier au Changement
Climatique

AC I : Anticorps primaire

AC II : Anticorps secondaire

BF : Bourgeon floral (ou floraux)

BFP : Biologie du Fruit et Pathologie

BIC : Bordeaux Imaging Center

BV : Bourgeon végétatif(s)

GIEC : Groupe d'experts intergouvernemental
sur l'évolution du climat

Crible : Plaque criblée

CTIFL : Centre Technique aux services de la
filière Fruits et Légumes

CWPC : Gène pariétal qui code pour les
protéines de la membrane plasmique

EI : espace interstitiel

GH17 : Glucane Hydrolase famille 17

GL : gouttelette lipidique

Gluta : Glutaraldéhyde

HRGP : Glycoprotéine riche en hydroxyproline

INRA : Institut National de la Recherche
Agronomique

ISPA : Interaction Sol Plant et Atmosphère

KCS : Ketoacyl-CoA Synthase

MET : Microscope Électronique à
Transmission

MP : Membrane plasmique

MYCSA : Mycologie et Sécurité des Aliments

P : Paroi

PDLP : Protéine localisée dans les
plasmodesmes

PFA : Paraformaldéhyde

Phlo : Phloème

PIV : Pôle d'Imagerie Végétale

Poly : Polyphénoles

ProtoP : Protophloème

ProtoX : Protoxylème

RE : Réticulum endoplasmique

RPM : Rotation par minutes

TPM : Transcrit par million

V : Vacuole

XTH : Xyloglucan : xyloglucosyl Transferase

Xyl : Xylème

Présentation de la structure d'accueil

L'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) est le premier institut de recherche agronomique en Europe, le deuxième mondial en science agricole. Son rôle implique la production et la diffusion des connaissances scientifiques. Toujours avec les mêmes dynamiques de recherche pour répondre aux enjeux de nos sociétés actuelles, l'INRA est composé de 17 centres sur l'ensemble du territoire français et possède son siège à Paris. Sa création a eu lieu après la Seconde Guerre mondiale avec l'objectif d'atteindre l'autosuffisance alimentaire. L'institut conserve encore aujourd'hui des dynamiques de recherches sur l'agriculture, mais a élargi son champ d'action en prenant en compte la part environnementale, écologique, de biologie et physiologie végétale.

L'étude présentée dans ce mémoire a été menée au sein du centre **INRA Bordeaux-Aquitaine**, se situant à Villenave-d'Ornon et dirigé par M. Hubert De Rochambeau. Ce centre, situé notamment à la Grande Ferrade, est l'un des 5 centres créé en 1946, mais ce n'est qu'une suite logique pour ce centre qui a été, dès 1925, le Centre de Recherches Agronomiques du Sud-Ouest (CRASO). Il comprend différentes unités de recherche comme Biologie du Fruit et Pathologie (**BFP**), Mycologie et Sécurité des Aliments (MYCSA) ou encore Interaction Sol Plant et Atmosphère (ISPA). Ce centre comprend également plusieurs parcelles expérimentales comme le site du domaine des Jarres à Toulence (Gironde) et le domaine de la Tour de Rance à Bourran (Lot-et-Garonne). Ces deux sites conservent plusieurs collections d'espèces fruitières (pêcher, prunier, cerisier et noyer) et participent à la mise en place de nouvelles variétés de cerisier.

Plus précisément, mon étude a été menée dans l'équipe 'Adaptation du Cerisier au Changement Climatique' (**A3C**) sous la direction du Dr Elisabeth Dirlwanger, rattachée à l'unité de recherche BFP dirigée par M. Thierry Candresse. Cette équipe travaille essentiellement sur la phénologie du cerisier et la qualité du fruit en lien avec le réchauffement climatique, mais conduit également un programme d'innovation variétale et mène des activités d'expertise.

Mon étude reposant sur des approches de microscopie, l'ensemble des expérimentations a été mené sur la plateforme d'imagerie cellulaire d'Aquitaine, Bordeaux Imaging Center (BIC), sous la responsabilité de Daniel Choquet et plus précisément sur le Pôle d'Imagerie Végétale (**PIV**), dirigé par Lysiane Brocard. Cette plateforme de microscopie à ultra-haute résolution travaille dans de nombreux projets de recherche et développement avec des collaborations régionales, nationales voire internationales. Le PIV est une structure polyvalente particulièrement dédiée à l'imagerie des tissus végétaux, de l'échelle macroscopique à l'échelle de la microscopie électronique, et à l'étude de leur organisation structurale.

Remerciement

Les mots me manqueront pour exprimer toute ma reconnaissance et mes remerciements à tous ceux qui m'ont encadrée et aidée pendant 6 mois.

Tout d'abord, je remercie très sincèrement ma maîtresse de stage Bénédicte Wenden chargée de recherche, qui m'a fait confiance tout au long de ces 6 mois de stage. Je la remercie pour son encadrement, pour la transmission de ses connaissances et pour son exemplarité en tant que femme forte, jeune chercheuse et mère. Et surtout, je la remercie pour la chance qu'elle m'a offerte avec cette expérience qui m'a enrichie et qui me permet aujourd'hui d'avoir plus de force pour une future profession.

Je remercie vivement tous les membres de l'équipe A3C, Elisabeth Dirlewanger, Mathieu Fouche, Laurent Richard, Lydie Fouilloux, Jacques Joly, Xavier Lafon, José Quero García, Hélène Chritmann, Teresa Barreneche et Loïk Le Dantec. Et mes pensées vont tout particulièrement aux trois thésards de l'équipe, Noémie Vimont, Rémi Beauvieux et Anthony Bernard à qui je souhaite encore de beaux jours en science. C'est une équipe formidable qui travaille quotidiennement avec la même envie. Je les remercie tous encore pour leur accueil, leurs conseils, leur bienveillance, pour le café, leurs histoires, leurs passions et surtout leur bonne humeur.

Je pense également à toute l'équipe du domaine des Jarres à Toulence, David Alletru, Loïc Le Cherbonnier, Julien Parmentier, pour leur aide dans les prélèvements.

Je tiens aussi à remercier chaleureusement toute l'équipe du PIV. Je remercie Leslie Bancel-Vallée pour tout son apprentissage théorique sur l'outil microscope, ses heures d'explications et son aide précieuse tout au long des expérimentations. Je remercie Brigitte Batailler pour son savoir-faire, la transmission de ses connaissances, sa disponibilité et sa gentillesse. Je remercie Catherine Cheniclet pour son attention, ses conseils, sa bienveillance et sa disponibilité. Et enfin, je remercie tout naturellement Lysiane Brocard pour m'avoir transmis cette offre de stage, pour son aide dans l'orientation de l'étude et ses conseils avisés, ses compétences, sa passion et surtout pour son infatigable bonne humeur. Une pensée toute particulière également à Clément Chambaud et William Nicolas pour leur partage d'expérience.

Et enfin, j'adresse mes remerciements à l'INRA Bordeaux-Aquitaine pour son accueil. Je pense également tous les partenaires pour les financements du projet global le « Gis Fruits », le CTIFL, SupAgro Montpellier, l'ANR et la région nouvelle Aquitaine. Je tiens enfin à remercier l'Université Bourgogne, bâtiment des Sciences Gabriel, pour l'opportunité de ce stage et pour ces plus de 5 ans d'accompagnement qui se finissent ici. Je pense ici à tous mes responsables de filière Dirk Redecker, Bernard Nicolardot, Nathalie Leborgne-Castel, Daniel Wipf et tous mes professeurs.

Sommaire

Liste des abréviations	3
Présentation de la structure d'accueil	4
Remerciement	5
1. Introduction	7
1.1. La dormance chez les espèces pérennes.....	7
1.2. Fonctionnement des bourgeons et physiologie de la dormance	8
1.2.1. Processus impliqués dans le contrôle de la dormance des bourgeons.....	8
1.2.2. Vascularisation et transport.....	9
1.2.3. Dynamique pariétale	9
1.2.4. Plasmodesmes.....	10
1.2.5. La callose	11
1.2.6. Dynamique des plasmodesmes et de la callose au cours de la dormance	11
1.3. Modèle d'étude.....	12
1.3.1. Le Cerisier	12
1.3.2. Bourgeons floraux et végétatifs.....	12
1.4. Objectif et stratégie	13
2. Matériels et méthodes	14
2.1. Matériel végétal	14
2.2. Observation en microscopie	14
2.2.1. Capacité de transport de calcéine au cours de la dormance.....	14
2.2.2. Visualisation de la callose au bleu d'aniline	15
2.2.3. Visualisation de la callose par immuno-fluorescence	16
2.2.4. Observations en ultra-structure des bourgeons.....	17
2.3. Analyse de l'expression de gènes d'intérêt.....	18
3. Résultats	19
3.1. Etude de la capacité de transport des bourgeons au cours de la dormance	19
3.2. Visualisation des dépôts de callose par le bleu d'aniline.....	20
3.3. Visualisation des dépôts de callose par immuno-fluorescence	21
3.4. Observation des bourgeons en ultra-structure	24
3.5. Profils d'expression de gènes d'intérêt	26
4. Discussion et perspectives	28
4.1. Mise au point des protocoles	28
4.2. Etude des processus impliqués dans les communications cellulaires au cours de la dormance ...	28
4.3. Modifications des structures cellulaires au cours de la dormance.....	30
Bibliographies	31
Annexes	33

1. Introduction

Les plantes représentent un patrimoine vital pour l'Homme pour son alimentation, sa santé et l'intégrité de son environnement. Au cours de leur cycle, les plantes sont confrontées à un ensemble de facteurs abiotiques et biotiques, tels que la disponibilité en eau, la lumière et la température. Ceci est particulièrement vrai pour les espèces dites pérennes qui, dû à leur cycle de vie de plusieurs années, doivent être plastiques et adaptées à leur environnement changeant. A l'heure actuelle, le réchauffement climatique, qualifié comme anthropique et d'une intensité sans précédent (Moisselin et al. 2002) perturbe grandement les conditions environnementales. Le rapport du GIEC de 2013 mentionne l'importance d'anticiper les changements globaux et leurs conséquences. D'un point de vue économique, la production des espèces pérennes forestières et fruitières est très importante en France, c'est pourquoi il est aujourd'hui primordial de porter une attention particulière à l'impact de ces changements sur le développement et la productivité de ces espèces pérennes directement touchées. Chez les arbres des zones tempérées, une des phases les plus affectées par l'évolution du climat est la phase de dormance qui est notamment contrôlée par la température.

1.1. La dormance chez les espèces pérennes

Le réchauffement climatique peut en particulier perturber le phénomène de dormance. Ce processus est un moyen mis en place par de nombreux de végétaux comme stratégie d'évitement ou encore de minimisation du risque de gel lors de la période hivernale dans les régions tempérées où les températures descendent en dessous de 0°C (Olsen 2010). Au cours de la dormance, les bourgeons, jeunes tissus et cellules méristématiques, entrent en état d'isolement afin d'éviter les dommages causés par le gel (Campoy et Egea 2011). Cette dormance peut également être définie comme «l'absence de croissance visible dans toute structure végétale contenant un méristème » (Rohde et Bhalerao 2007). La dormance des plantes pérennes a été caractérisée en deux phases principales, l'endodormance suivie de l'écodormance (Lang et al. 1987) qui sont finement réglées en fonction des températures et de la photopériode. En particulier, une sortie adéquate de dormance est essentielle pour assurer une floraison et une production optimales chez les arbres fruitiers.

L'endodormance (fig1) représente la dormance telle qu'elle est communément définie : une dormance hivernale profonde. Il s'agit d'une répression endogène, contrôlée par des conditions physiologiques internes. Pour lever l'endodormance, un cumul de froid est nécessaire spécifique selon les espèces et les variétés, jusqu'à satisfaction des besoins en froid pour passer à la phase suivante, l'écodormance.

L'écodormance (fig1), parfois nommée quiescence, est un intermédiaire entre la fin de l'hiver et le printemps. Le contrôle de sa levée, qui mène au débourrement ou à la floraison, se fait par accumulation de chaud et selon un déterminisme majoritairement environnemental.

Endo- et écodormance se terminent avec la fin du cumul de froid et de chaud et le retour des températures printanières. (Girault 2009).

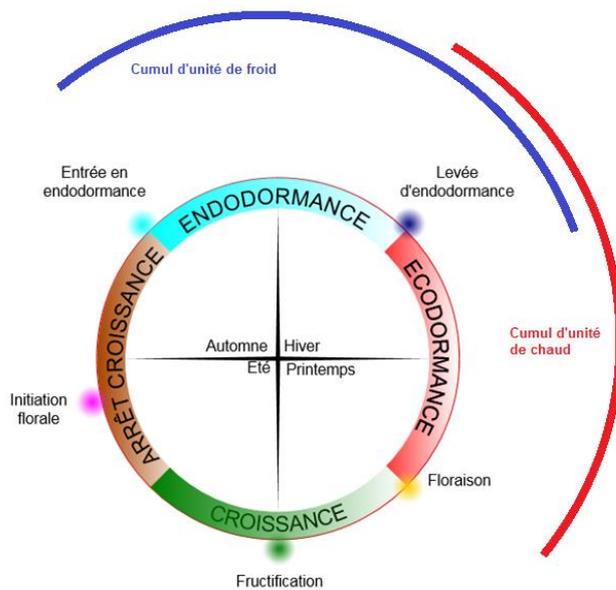


Figure 1 : Cycle biologique des espèces pérennes, avec la représentation des accumulations de froid et de chaud (source : équipe A3C)

Ce système finement réglé avec la température est actuellement perturbé par le réchauffement terrestre entropique, notamment avec une sortie d'écodormance et une floraison précoces, provoquant des risques accrus de gels qui peuvent détruire la future production. De plus, en raison d'un manque de besoin en froid au cours de l'endodormance, d'autres impacts attendus seront des retards de phénologie ou des bourgeons nécrosés, ce qui pourra avoir des répercussions pour les producteurs de fruits.

1.2. Fonctionnement des bourgeons et physiologie de la dormance

1.2.1. Processus impliqués dans le contrôle de la dormance des bourgeons

Au cours de la dormance, le développement des bourgeons est contrôlé par un grand nombre de processus moléculaires, hormonaux et physiologiques. La croissance du bourgeon va notamment dépendre de ses réserves et de sa capacité à importer, à synthétiser et à utiliser des nutriments. Dans le règne végétal, il existe plusieurs formes de réserves, comme l'amidon, le saccharose, le glucose, le fructose et d'autres sucres solubles, ainsi que des lipides et des composés azotés comme des protéines et des acides aminés (Girault 2009). L'étude du sorbitol a également montré un rôle important, comme molécule d'intérêt dans la régulation de l'osmolarité (Loescher 1987), mais aussi dans les mécanismes de protection contre le froid (Bieleski et Redgwell 1982). Ces molécules de réserves seront notamment réallouées lors de la sortie de dormance, comme l'hydrolyse des réserves amylacées du bourgeon lors du débourrement (Sood et al. 2006). De plus, en parallèle de ces molécules, on retrouve également des changements physiologiques avec l'action de plusieurs phytohormones comme l'acide abscissique (ABA) et les gibbérellines. Elles agissent via des accumulations dans les bourgeons d'ABA qui bloquent la croissance pendant l'automne et l'hiver. Les gibbérellines sont des antagonistes de l'ABA qui contribuent au débourrement en tant que phytohormone de croissance (à cette étape, c'est la levée complète de la dormance, stade B et C) (Nabors 2008). En plus des métabolites secondaires et phytohormones, des mécanismes cellulaires tels que la vascularisation et la dynamique pariétale jouent un rôle important dans la physiologie des bourgeons dormants. Au cours de la dormance, les communications entre cellules et organes sont réorganisés. Un rééquilibrage osmotique est mis en place, avec l'exclusion de l'eau des cellules et un

blocage des canaux de transport, limitant par ce fait la formation de glace intra-cellulaire (Tanino et al. 2010). De plus, une partie du système vasculaire est bloqué pour limiter les interactions au niveau du bourgeon et entre le bourgeon et le reste du rameau. De nombreuses études suggèrent qu'après une accumulation de froid suffisante, les communications sont rétablies et la dormance est levée (Rinne et al. 2011). Au cours de cette étude c'est tout particulièrement le moment de la transition vers la levée de dormance qui nous a intéressé.

1.2.2. Vascularisation et transport

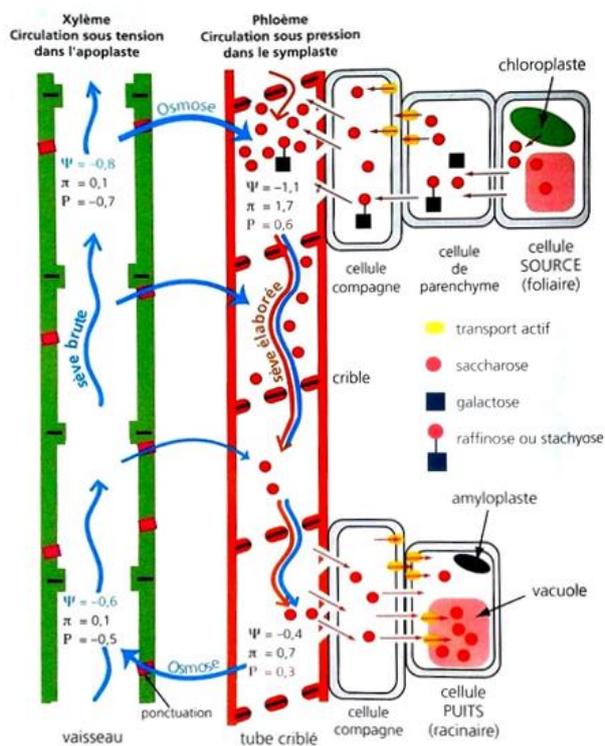


Figure 2 : Hypothèse de circulation de la sève élaborée selon Münch, processus de chargement et déchargement du phloème. Ψ : potentiel hydrique (MPa) ; π : pression osmotique ; P : pression hydrostatique (MPa) (source : Meyer et al. 2008)

Les plantes vascularisées possèdent un système élaboré de tissus conducteurs (fig2), se divisant à partir du cambium. Le xylème (fig2) permet une circulation de la sève brute des racines vers les parties aériennes à sens unique, tandis que la sève élaborée circule dans les deux sens dans le phloème (fig2). On parle alors de chargement et de déchargement du phloème, avec la notion d'organe source (feuilles) et d'organe puits (fruit, bourgeon, racine, structure de réserve). Ces échanges se font par la voie apoplastique (à travers plusieurs perforations de la paroi pour le xylème) ou symplastique (via les plasmodesmes) pour le phloème. Contrairement au phloème qui utilise la voie symplastique. Le phloème est composé de longues cellules, appelées tubes criblés, dont les parois transversales sont trouées (criblées), mais aussi de pores latéraux (Meryer et al. 2008 ; Patrick 1997 ; Pfautsch et al. 2015 ; Van Bel 1989). Plusieurs

travaux suggèrent que lors de la dormance le système de vascularisation, et plus particulièrement la voie symplastique, est interrompu (Rinne et al. 2011). Cette hypothèse implique directement le phloème comme l'un des éléments physiologiques qui explique la dormance, mais ce n'est pas seul.

1.2.3 Dynamique pariétale

Jian et al. (1997) ont observé un système pariétal plus épais dans les bourgeons dormants de peuplier, ce qui laisse suggérer une composition modifiée. Ce système est une paroi rigide dite pecto-cellulosique (fig3) composée de plusieurs feuilletts : la lamelle moyenne, la paroi primaire et secondaire. Parmi ses composants, on retrouve majoritairement de la cellulose (fig3) dont la quantité

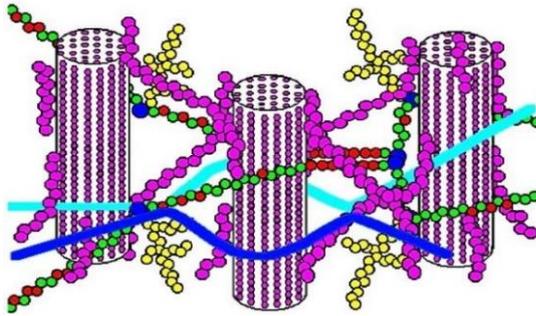
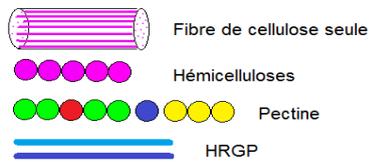


Figure 3 : Schéma structural de la paroi pecto-cellulosique (source : R.Prat, Biologie et Multimédia - Université Pierre et Marie Curie)



est directement corrélée à l'âge de la cellule. Les fibres de cellulose sont liées par des chaînes d'hémicellulose (fig3) enchâssées, la pectine (fig3) possédant un rôle de ciment. Enfin, les glycoprotéines riches en hydroxyproline (fig3) (HRGP) également appelées extensines, participent à la consolidation du réseau de fibrilles de la paroi, notamment en s'associant aux ions Ca^{2+} . Certaines substances cireuses présentes au niveau de la paroi de façon ponctuelle peuvent empêcher les échanges d'eau et gaz, c'est le cas de la subérine, polymère lipidique enchâssé dans les molécules de la paroi sous la forme de structures en feuillet. La paroi est une structure rigide, mais pas stricte, elle permet aussi des échanges par diffusion, par voie

symplastique et par voie apoplastique. Les plasmodesmes contrôlent ces échanges symplastiques et leur dynamique serait impliquée dans le contrôle de la dormance (Rinne et al. 2011).

1.2.4. Plasmodesmes

Les plasmodesmes (fig4) sont de petits canaux pariétaux d'environ 50 nm de diamètre, impliqués dans les communications inter-cellulaires. Ils sont bordés par un domaine spécifique de la membrane plasmique (Grison et al. 2015) et d'un élément central issu du réticulum endoplasmique, le

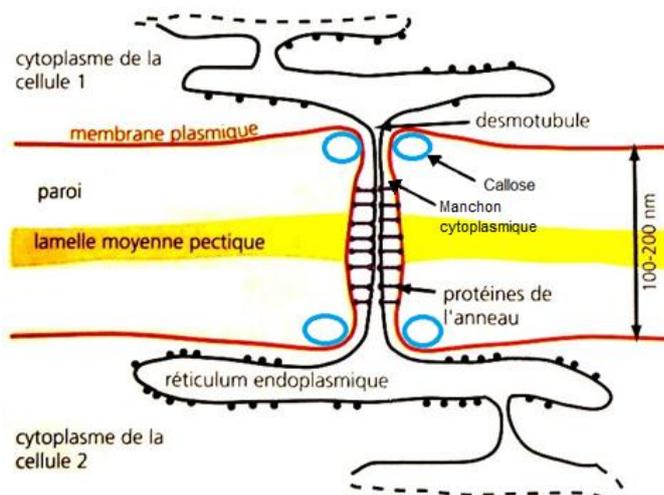


Figure 4 : Représentation d'un plasmosome, extrait de Botanique de Meyer et al.,2008 et complété selon Ehlers et Kollmann (2001)

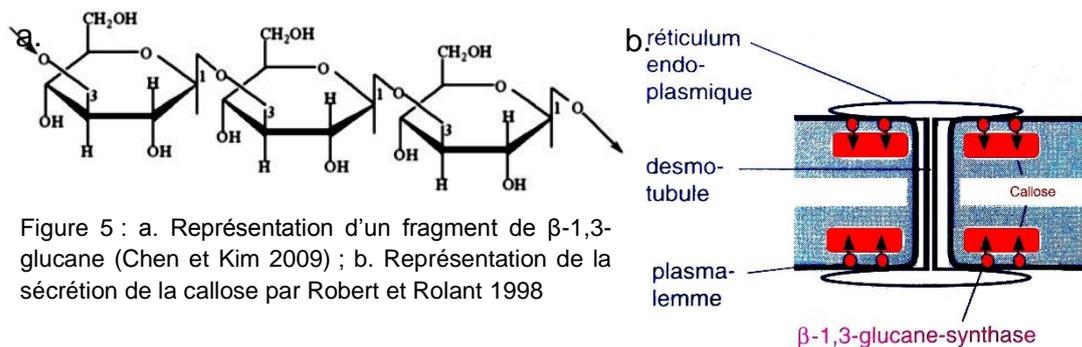
desmotubule (fig.4). Entre la membrane plasmique et le desmotubule se trouve le manchon cytoplasmique où des macromolécules (des protéines, des acides nucléiques, des photoassimilats) peuvent transiter de cellule à cellule. Ainsi les plasmodesmes établissent une continuité membranaire et cytosolique entre la plupart des cellules de la plante (Ehler et Kollmann 2001). Cette communication intercellulaire joue un rôle primordial dans le développement des plants et dans la coordination des fonctions physiologiques.

On distingue deux types de plasmodesmes, les plasmodesmes dits primaires et les plasmodesmes dits secondaires qui se différencient par leur mode de formation. Les plasmodesmes sont des structures hautement dynamiques capables de moduler leur perméabilité en réponse aux stress et processus

physiologiques (Otero et al. 2016). Le mécanisme le plus connu de régulation de la perméabilité des plasmodesmes implique l'homéostasie de la callose (fig4).

1.2.5. La callose

La callose est un glucan, polymère de glucose unis par des liaisons osidiques (fig 5.a), très présente chez les plantes supérieures notamment au niveau des parois. les dépôts de callose sont contrôlés par des enzymes de synthèse et de dégradation appartenant à des familles multigéniques : (1) les callose-synthases (CalS, fig5.b), et (2) les β -1,3-glucanases, de la famille des *GH17*.



Ces gènes sont notamment exprimés en réponse aux stress biotiques et abiotiques et ont des expressions différentielles selon le tissu, le stade de développement, et la famille botanique (Piršelová et al. 2013). L'homéostasie de la callose est hautement régulée au cours de nombreux processus de développement ainsi que dans des réponses à des stress biotiques ou abiotiques (Sager et Lee 2014). Les observations suggèrent que la callose se dépose à l'entrée des plasmodesmes et, en poussant la membrane plasmique contre le desmotubule, est impliquée dans la limitation des échanges symplastiques (Chen et Kim 2009).

1.2.6. Dynamique des plasmodesmes et de la callose au cours de la dormance

Plusieurs études ont montré qu'au cours de la dormance, un dépôt de callose au niveau des plasmodesmes bloquait le transport symplastique dans le méristème des bourgeons végétatifs et la plaque criblée des cellules de phloème est bloquée par de la callose (Rinne et van der Schoot 1998 ; Ruonala et al. 2008 ; Levy et Epel 2009). La callose a un rôle clef dans la protection mécanique et l'isolement des jeunes tissus méristématiques contre le froid extérieure (Aloni et Peterson 1991 ; Aloni et Peterson 1997 ; Botha et al. 2000) et dans le contrôle direct de la fermeture et l'ouverture des plasmodesmes. Rinne et al. (2011) ont démontré une dynamique et une rotation dans les périodes de dégradation de la callose sur peuplier en étudiant l'expression de dix gènes de la famille des *GH17* au cours de la dormance des bourgeons végétatifs. Ils ont notamment observé une régulation et un contrôle de l'expression de ces gènes directement liés à la photopériode, aux températures froides et à la réponse aux gibbérellines (GA3 et GA4). Ces résultats confirment les observations de Krabel et al. (1993) qui avait déjà détecté une activité de dégradation de la callose au printemps au niveau des cellules phloémiennes sur le frêne, l'érable et le saule. Sur cerisier, les gènes de dégradation de la callose (*GH17*) ont également été identifiés pour leur rôle potentiel dans la floraison et la dormance (Castède et al. 2015).

1.3. Modèle d'étude

1.3.1. Le Cerisier

La cerise est une production d'intérêt dans l'alimentation humaine aussi bien par sa consommation comme produit frais (cerise de table) que comme produit transformé (confiture ou sirop). Sa production mondiale s'élève à près de 2 millions de tonnes par an selon la FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations), à raison de 35 000 tonnes de cerises qui sont produites en moyenne chaque année en France. Sa consommation en France est de l'ordre de 1Kg/habitant/an, mais elle reste variable et se déroule sur 3 mois de mai à juillet (Lichou et al. 1990). Le cerisier est une espèce de la famille des *Rosaceae* qui a été domestiquée par l'homme. Les variétés de cerisier doux ont été domestiquées à partir de *Prunus avium* L. Chaque variété présente des critères et des axes de sélection différents pour permettre sa culture dans des conditions variées et notamment avoir des périodes de fructification différentes et ainsi avoir une production sur une période plus longue. D'un point de vue phénologique, le cerisier est une espèce dont le développement est fortement régulé par la température notamment pour l'entrée que la sortie de dormance, ainsi que pour sa floraison. Dans le contexte du réchauffement climatique, il est donc essentiel de développer des variétés adaptées aux futures conditions climatiques. Dans l'idéal, ces variétés seraient caractérisées par de faibles besoins en froid et de forts besoins en chaud afin d'éviter les gelées de printemps. Dans ce contexte, la compréhension des mécanismes de dormance est essentielle pour identifier les cibles des stratégies d'amélioration variétale.

1.3.2. Bourgeons floraux et végétatifs

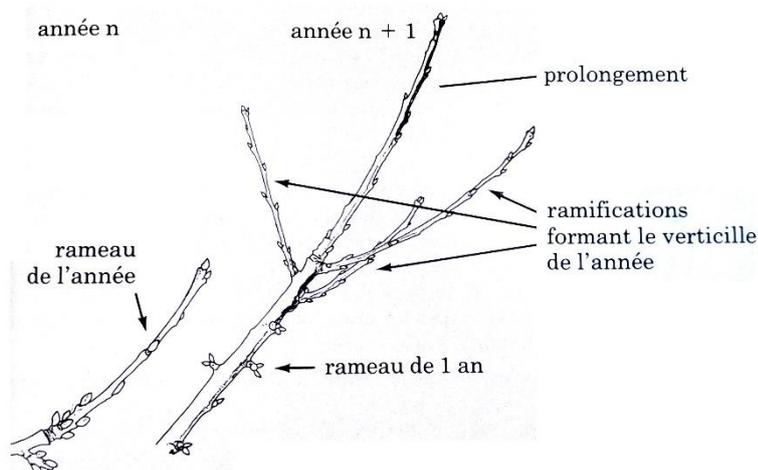
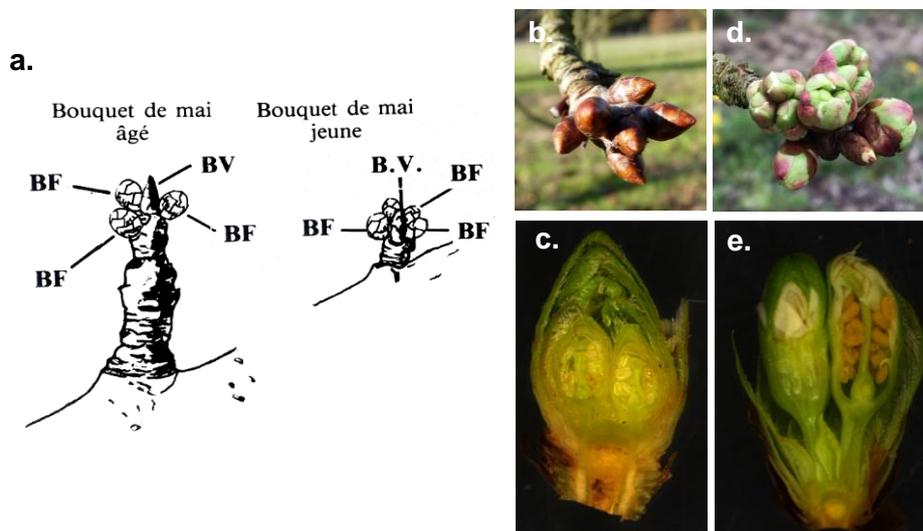


Figure 6 : Formation des rameaux sur cerisier (dessin M.Jay, source : Le cerisier ctifl 1990)

Les bourgeons sont des organes composés d'un axe très court (future tige, rameau ou fleur) qui, chez les plantes ligneuses, portent des ébauches foliaires (avec les zones méristématiques) et/ou florales, recouvertes d'un agencement d'écailles (bourgeons écailleux) (Marouf et Reynaud 2007). Chez le cerisier, les bourgeons floraux (BF) (fig7.a-e) et végétatifs (BV) sont bien définis et ont une différenciation très tôt au cours du cycle (dès juillet).

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux rameaux courts présents sur les portions de branches de plus de deux ans, appelés bouquets de mai (fig7.a), car ils assurent la plus grande partie de la production sur un arbre adulte. Leur intérêt est notamment qu'il est possible d'identifier les bourgeons en tant que BF ou BV, par leur position sur le rameau (fig6). Un BV contient les zones méristématiques, il donnera des feuilles et potentiellement un jeune rameau. Un BF ne contient que les ébauches florales et est à croissance déterminée. Chaque bouquet de mai peut contenir entre un

et cinq BF dès sa première année, mais peut dépasser la dizaine après quelques années. Chaque BF peut contenir entre une et cinq fleurs



La phénologie du bourgeon peut être découpée en plusieurs stades de A à J, représentant toutes les étapes du bourgeon dormant au fruit mature (annexe1). Les dates correspondant à ces différents stades sont propres à chaque variété. La dormance, stade A, se caractérise par un ensemble de changements anatomiques notamment avec la formation d'écaillés, qui sont des feuilles modifiées en périphérie des bourgeons formant un isolant contre le froid et le dessèchement.

1.4. Objectif et stratégie

Dans le contexte actuel de changement climatique, il est essentiel d'identifier les leviers de sélection pour développer des variétés adaptées au changement climatique. Pour le cerisier doux, un des principaux défis à relever est la diminution des besoins en froid en prévision des hivers doux. En conséquence, les stratégies d'amélioration doivent être soutenues par une meilleure compréhension des mécanismes associés à la dormance et la réponse aux températures. Une des pistes envisageables est d'explorer le rôle des plasmodesmes et des dépôts de callose dans les dynamiques de transport et la reprise d'activité des bourgeons au cours de la période hivernale.

L'objectif de cette étude a été d'étudier les dépôts de callose au cours de la dormance des bourgeons floraux de cerisier doux. Plusieurs axes sont abordés : i) Phénotypage des capacités de transport des bourgeons au cours de la dormance ii) Observation histo-cytologique des dépôts de callose et des structures cellulaires dans les bourgeons floraux au cours de la dormance iii) Exploration des profils d'expression de gènes d'intérêt au cours de la dormance. Pour i) et ii), des protocoles de préparation et d'observation en microscopie (microscope à épifluorescence, microscopie utilisant la technique confocal et microscopie électronique à transmission) sur bourgeon de cerisier ont été élaborés. Concernant une approche moléculaire iii), elle concerne l'analyse de données de RNA-seq, jeu de données collecté par Noémie Vilmont en thèse au sein de l'équipe A3C.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériel végétal

L'analyse a été menée sur deux variétés de cerisier doux contrastées dans leurs dates de levée de dormance : une variété précoce 'Burlat' et une variété tardive 'Fertard'. Les rameaux ont été prélevés dans les parcelles expérimentales de l'INRA Bordeaux Aquitaine, site de Toulence (44°34'N 0°16'W) et conservées, jusqu'à 3 jours, dans de l'eau et à l'extérieur.

La date de levée de l'endodormance est phénotypée par une technique de forçage. Les rameaux sont placés en chambre climatisée à 25°C avec 16h de jour et 8h de nuit. Après dix jours en forçage, le stade de développement des bourgeons est observé. La date de levée de dormance est estimée lorsqu'au moins 50% des bourgeons a atteint le stade C (% stade C, annexe1).

Les observations en microscopie ont été réalisées sur des BF au stade A provenant des bouquets de mai (fig7.a).

2.2. Observation en microscopie

Au cours de ce projet, j'ai mis au point les protocoles d'observation, ceux détaillés ici sont ceux qui ont permis d'obtenir les résultats présentés.

2.2.1. Capacité de transport de calcéine au cours de la dormance

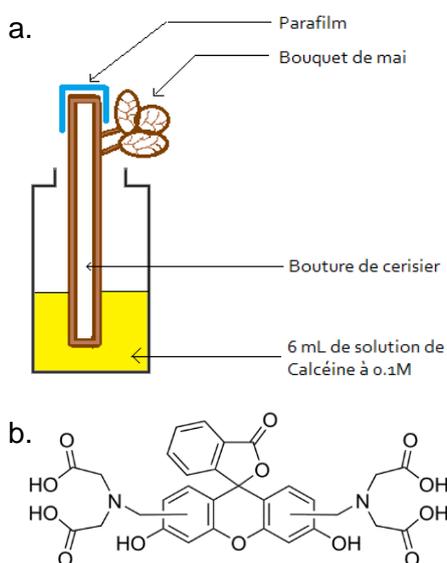


Figure 8 : a. schéma du montage pour un pilulier ; b. molécule de calcéine

Six boutures par variété, correspondant à un entrenœud de rameau comportant un bouquet de mai, sont mises à tremper pendant 24h dans une solution contenant de la calcéine, un complexe de fluorescéine qui a la particularité de pouvoir circuler d'une cellule à l'autre (fig8.b) (Rinne et al. 2011).

Un contrôle négatif a été réalisé avec deux boutures laissées dans de l'eau pour chaque variété. Chaque bouture est placée dans un pilulier contenant 6 mL de solution de calcéine à 0.1M (soit 0.1g de calcéine en poudre – Sigma C0875-5G – pour 100mL d'eau milliQ) (fig8.a). Les piluliers sont disposés dans un portoir puis dans une mini-serre (fig9) recouverte de papier d'aluminium, pour éviter d'exposer le fluorochrome à la lumière.





Figure 10 : Macroscopie Axio Zoom Zeiss V.16

Après incubation, les échantillons sont observés à raison de 5 bouquets de mai par variétés (trois BF et un BV par bouquet de mai). Pour manipuler et observer correctement chaque bourgeon, nous avons retiré les écailles à l'aide de pinces, puis réalisé une coupe le plus au centre possible du bourgeon à l'aide d'une lame de rasoir. Chaque bourgeon a ensuite été observé sur le macroscopie Axio Zoom Zeiss V.16 (fig10) couplé au logiciel Zen Bleu. L'acquisition des images a été réalisée en épi-illumination et/ou en lumière transmise, et en épifluorescence. Les filtres d'excitation et d'émission utilisés pour l'observation de la calcéine ont respectivement des bandes passantes de 460-488nm et 500-548 nm. L'auto fluorescence a été estimée avec des filtres d'excitation et d'émission de bandes passantes respectives 540-580 nm et >593 nm.

L'analyse d'image et le calcul du ratio spatial de la fluorescence verte sur la fluorescence rouge ont été réalisés avec le logiciel Image j. Un seuillage automatique est appliqué à chaque image par la commande Threshold afin d'obtenir une image binaire permettant de délimiter les aires fluorescentes des non-fluorescentes à la fois pour le canal de la calcéine et de l'auto-fluorescence. L'aire correspondant aux pixels d'intérêt est calculée par la commande Analyse Particles, Cette commande répétée sur chaque photo nous a permis d'obtenir la surface correspondant à la fluorescence rouge et vert et d'estimer la diffusion de la calcéine au sein de l'échantillon grâce au ratio aire verte/aire rouge.

2.2.2. Visualisation de la callose au bleu d'aniline

Des coupes longitudinales de bourgeons de 50 μm d'épaisseur (microtome à lame vibrante, Microm 650 V) sont fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) à 4 % dans du tampon phosphate 0.1 M pH 7.2 pendant 1h à température ambiante. Chaque coupe d'intérêt (nette, homogène, contenant des primordiaux floraux) est rincée trois fois dans du tampon Phosphate 0.1 M avant d'être montée entre lame et lamelle avec 25 μL de bleu d'aniline (Biosupplies, dilution au 10/1000). En parallèle, la conservation de la structure est confirmée grâce à une coloration au bleu de toluidine.



Figure 11 : Microscopie à épifluorescence Zeiss Axiophot

Les échantillons ont été observés avec un microscope à épifluorescence Zeiss Axiophot (fig11), équipé d'un filtre d'émission et d'excitation avec des bandes passantes respectives 450-490 nm et >520 nm.

2.2.3. Visualisation de la callose par immuno-fluorescence

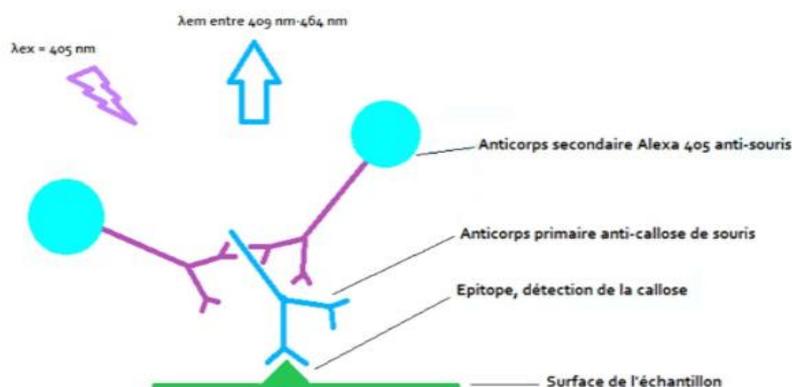


Figure 12 : Représentation schématique de l'immunomarquage. Reconnaissance par l'AC I de la callose, complexe détecté par un AC II couplé à un fluorochrome (Alexa 405) détectable en épifluorescence.

Les coupes fixées tel que décrit précédemment sont disposées sur une lame à puits (revêtement en téflon permettant de réaliser une gouttelette, CML-LI10P7TE) et tout excédant de solution est retiré à l'aide d'une micropipette et de papier Whatman.

Les sites antigéniques non spécifiques sont saturés grâce à une solution contenant du Normal Donkey Serum (NDS) dilué à 5% dans du MTSB, pendant 2h dans une boîte humide à température ambiante. Après avoir retiré la solution de NDS, 25 μ L de la solution contenant les anticorps primaires, AC I (fig12), (Anticorps monoclonal de souris dirigé contre le 1.3- β -Glucane, Biosupplies cat.No.400-2) dilués au 1/200^{ème} dans du NDS à 5% contenant des traces de Tween sont appliqués sur les coupes. Après incubation pendant une nuit dans une boîte humide à 4 °C, les échantillons sont transférés à 37°C pendant 2 h. Après rinçage, 25 μ L d'anticorps secondaires, AC II (fig12), (Anticorps de chèvre anti-souris, couplé à une Alexa 405, (Thermo Fisher A-311553) dilués au 1/200^{ème} dans du NDS à 5 % avec TWEEN, sont déposés sur les coupes. Un témoin technique est réalisé sans AC I, mais avec AC II, est réalisé. Les échantillons sont placés 2 h à 37 °C à l'obscurité avant d'être rincés trois fois avec MTSB. Les coupes sont montées sur une nouvelle lame avec du CitiFluor™.



Figure 13 : Microscope confocal Zeiss LSM 880

Les coupes sont observées sur un Microscope confocal Zeiss LSM 880, couplé au logiciel Zen Black (fig13). L'AC II Alexa 405, est excité avec une diode 405 nm (dans l'UV) et la bande de réception correspond à 409-464 nm. En parallèle, l'autofluorescence est observée grâce à l'utilisation d'une diode 561 nm et une fenêtre de réception 644-728 nm.

2.2.4. Observations en ultra-structure des bourgeons

Préparation d'échantillons (annexes2-3)

Le but a été d'obtenir du matériel biologique fixé et inclus en résine à différentes dates au cours de la dormance. Le protocole n'ayant pas été testé auparavant sur bourgeons de cerisier, plusieurs tests ont été réalisés notamment concernant le type de résine utilisée et les différents fixateurs.

- *Fixation et déshydratation*

Des coupes longitudinales de 150 μm et de 500 μm d'épaisseur de bourgeons ont été réalisées à l'aide d'un microtome à lame vibrante et fixées (PFA 2.5 %, glutaraldéhyde 2.5 % dilués dans du tampon phosphate 0.1 M PH 7,2). Les échantillons sont dégazés et infiltrés grâce une séquence progressive de vide jusqu'à 200mbars (dans un dessiccateur) (annexe2-3). Les coupes sont rincées trois fois dans du tampon phosphate 0.1 M. Les échantillons sont post-fixés avec 2% de tétroxyde d'osmium dilué dans du tampon phosphate 0,1M PH 7,2 pendant 45min à température ambiante. L'osmium (OsO_4 , 2 %) évite l'extraction de certains composants lors de la déshydratation comme les lipides et permet de contraster les échantillons pour l'observation au Microscope Electronique à Transmission (MET ; Sigma). Après trois rinçages à l'eau, les échantillons sont déshydratés grâce à des bains avec un pourcentage croissant d'éthanol jusqu'à 100%.

- *Imprégnation et polymérisation*

Plusieurs résines ont été testées (HM20, LR white, SPURR), afin d'identifier la plus adaptée aux bourgeons. Les deux retenues ont été la résine SPURR et LR-white. L'imprégnation est réalisée grâce à des bains successifs où l'éthanol est remplacé progressivement par des pourcentages croissants de résine (25%, 50%, 75%, 100%). Pour chaque bain les temps d'imprégnation ont dû être allongés jusqu'à 24 h. Afin de polymériser les deux types de résines en même temps, une température de 65°C pendant 24h est utilisée (annexe2-3).

- *Ultramicrotome*

Des coupes semi et ultra-fines sont confectionnées à l'aide d'un ultra-microtome Reichert UltracutS (fig14.b). Les régions d'intérêt sont ciblées grâce à l'observation au microscope photonique de coupes semi-fines colorées au bleu de toluidine. Ensuite des coupes ultra-fines de 90 nm sont effectuées

avec un couteau de diamant avant d'être déposées sur des grilles en cuivre respectivement de 300 Mesh pour le SPURR et de 400 Mesh pour la LR-White.

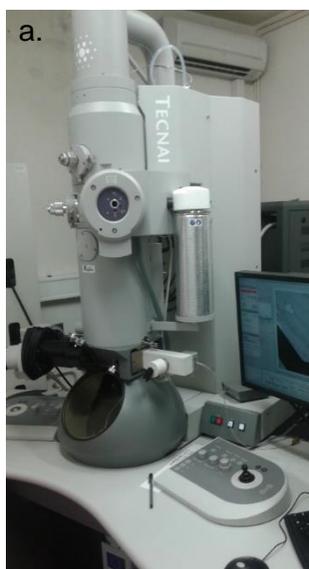


Figure 14 : a. Microscope électronique à transmission FEI Technai spirit ; b. l'Ultra-microtome Reichert Ultracut S.

Observations en MET

Les observations ont été réalisées avec un Microscope électronique à transmission (MET) FEI Tecnai spirit (fig14.a) couplé à une caméra en bas de colonne Eagle 4K.

Les mesures de taille des parois et des plasmodesmes ont été réalisées sur Image j avec les outils « Straight » qui permet tout d'abord de tracer un segment entre les deux extrémités de la zone d'intérêt avant de mesurer sa longueur avec l'outil « mesure ». Pour chaque paroi, l'épaisseur estimée correspond à la moyenne de trois points de mesure différents. Les estimations d'épaisseurs sont issues d'un échantillonnage où N=30 (fig15.a).

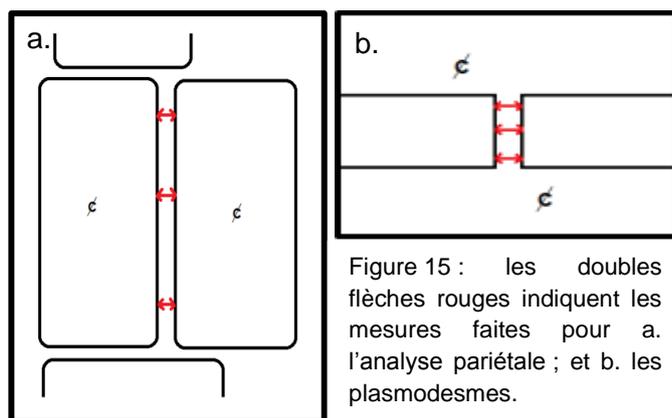


Figure 15 : les doubles flèches rouges indiquent les mesures faites pour a. l'analyse pariétale ; et b. les plasmodesmes.

Trois mesures de largeur ont été réalisées par plasmodesme (N=30, fig15.b). Ces valeurs ont été répertoriées dans un fichier Excel pour une analyse statistique sur R Studio. Après test de la normalité des données (shapiro.test), un test de comparaison de moyenne a été appliqué (t.test ou wilcox.test) et la réalisation de boîte à moustache par la fonction boxplot.

2.3. Analyse de l'expression de gènes d'intérêt

Cette analyse a été réalisée à partir d'un jeu de données d'expression RNA-Seq obtenu en 2017 dans le cadre du projet de thèse de Noémie Vimont (équipe A3C).

De juillet 2015 à mars 2016, des bourgeons floraux ont été prélevés tous les mois à l'Unité Expérimentale Arboricole pour les variétés 'Regina' (deux répétitions biologiques), qui est une variété tardive similaire à 'Fertard', et 'Burlat' (trois répétitions biologiques, chaque répétition correspondant à un arbre). Pour chaque prélèvement, de juillet à mars, les bourgeons floraux (avec leurs écailles) ont été échantillonnés et directement plongés dans l'azote liquide, puis broyé également à froid. L'ARN a été extrait à partir de 50-70 mg de poudre (Qiagen RNeasy® Plant Minikit), puis préparé avec le kit Truseq Stranded mRNA Library Prep Kit (Illumina) et séquencé en utilisant un appareil MiSeq (Illumina). Par la suite les séquences obtenues ont été alignées sur le pêcher, *Prunus persica.L.*, espèce très proche du cerisier (Dirlewanger et al. 2004) et dont le génome est disponible. L'analyse d'expression et les représentations graphiques des gènes d'intérêt ont été réalisées sous R Studio (annexes7-8) à partir des données de comptage pour chaque transcrit (TPM, transcrits par millions de reads). Les heat maps (ou cartes thermiques pour la représentation graphique des données) ont été réalisés en utilisant les données d'expression centrées réduites (z-score), ainsi homogénéisées pour comparer les profils d'expression. Les gènes conservés pour l'analyse sont ceux dont la valeur moyenne des TPM était supérieure à 15 et présentant une dynamique d'expression au cours de la dormance.

3. Résultats

3.1. Etude de la capacité de transport des bourgeons au cours de la dormance

Plusieurs études publiées ont montré que les voies symplastiques étaient obstruées pendant la dormance. Suivant ces observations et les analyses menées par Rinne et al. (2011), nous avons évalué la connectivité des tissus vasculaires au sein des bourgeons et entre le rameau et les bourgeons au cours de la dormance. L'hypothèse est que dans un bourgeon dormant isolé, les communications entre cellules et entre organes sont bloquées et toute circulation coupée ; à l'inverse d'un bourgeon en sortie de dormance, c'est-à-dire en reprise d'activité, dans lequel la capacité de transport est rétablie. Une façon d'étudier et de quantifier ce phénomène est de suivre le transport d'une molécule fluorescente entre le bas du rameau et le bourgeon, tel que proposé par Rinne et al. (2011). Nous avons comparé des bourgeons issus de rameaux de 'Burlat' et 'Fertard' prélevés à différentes dates au cours de la dormance (Figure 16).

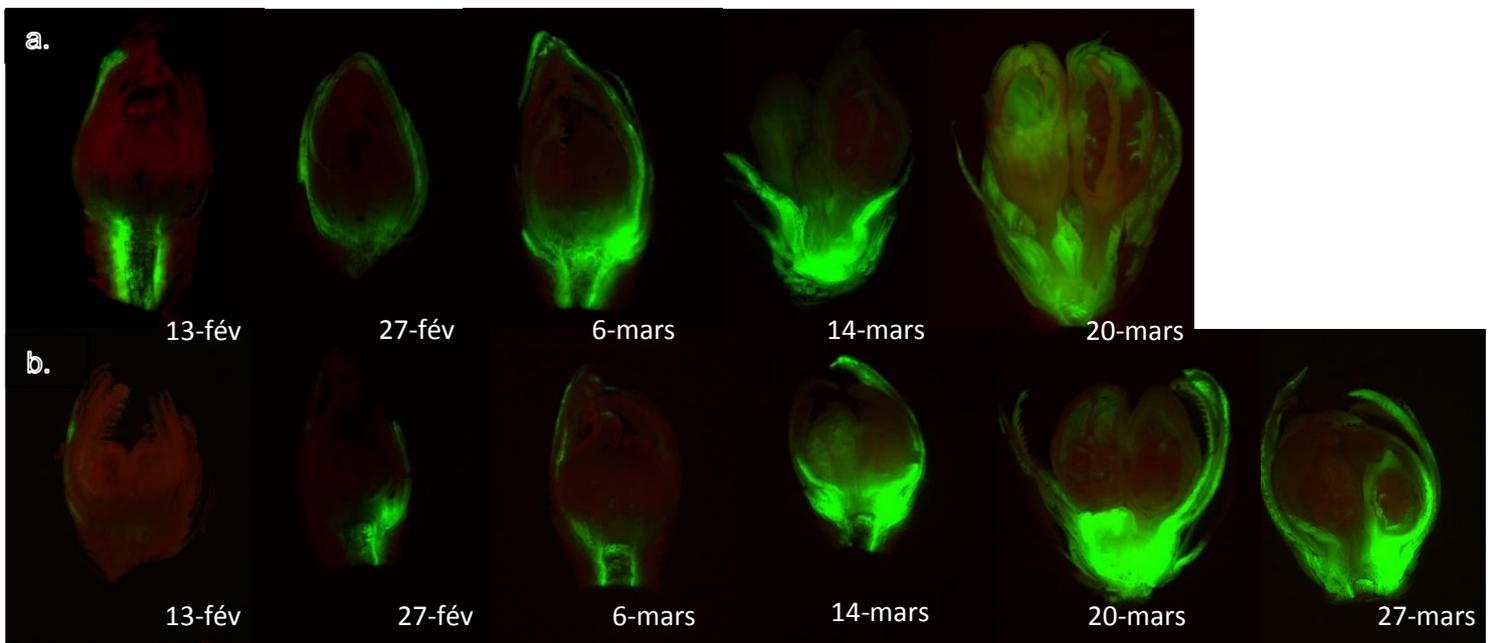


Figure 16 : Présentation du signal de fluorescence dans des bourgeons des variétés 'Burlat' en (a) et 'Fertard' (b) après 24 h d'incubation dans de la calcéine, au cours de la dormance. La fluorescence verte correspond au marquage calcéine (traitement 24 h) et la fluorescence rouge à l'autofluorescence du bourgeon.

Les résultats montrent que la calcéine n'est pas transportée avec la même efficacité selon le stade de dormance, et avec des chronologies différentes pour les deux variétés (fig17.a). Pour la variété 'Burlat', on observe que l'efficacité du transport de calcéine augmente de façon graduelle avec l'avancée de la levée de dormance tandis que pour 'Fertard', qui est une variété plus tardive, le transport de calcéine est très limité jusqu'au 6 mars où l'on aperçoit un décrochement rapide, correspondant à la date estimée de levée de dormance (fig17.b). On observe aussi un décalage dans le temps de la reprise du transport entre les deux variétés qui traduit leur comportement tardif et précoce. Ce profil de dynamique de flux de calcéine qui marque la capacité de transport est corrélée

avec la date de levée de dormance telle qu'estimée avec les données de forçage (14 février pour 'Burlat', 6 mars pour 'Fertard').

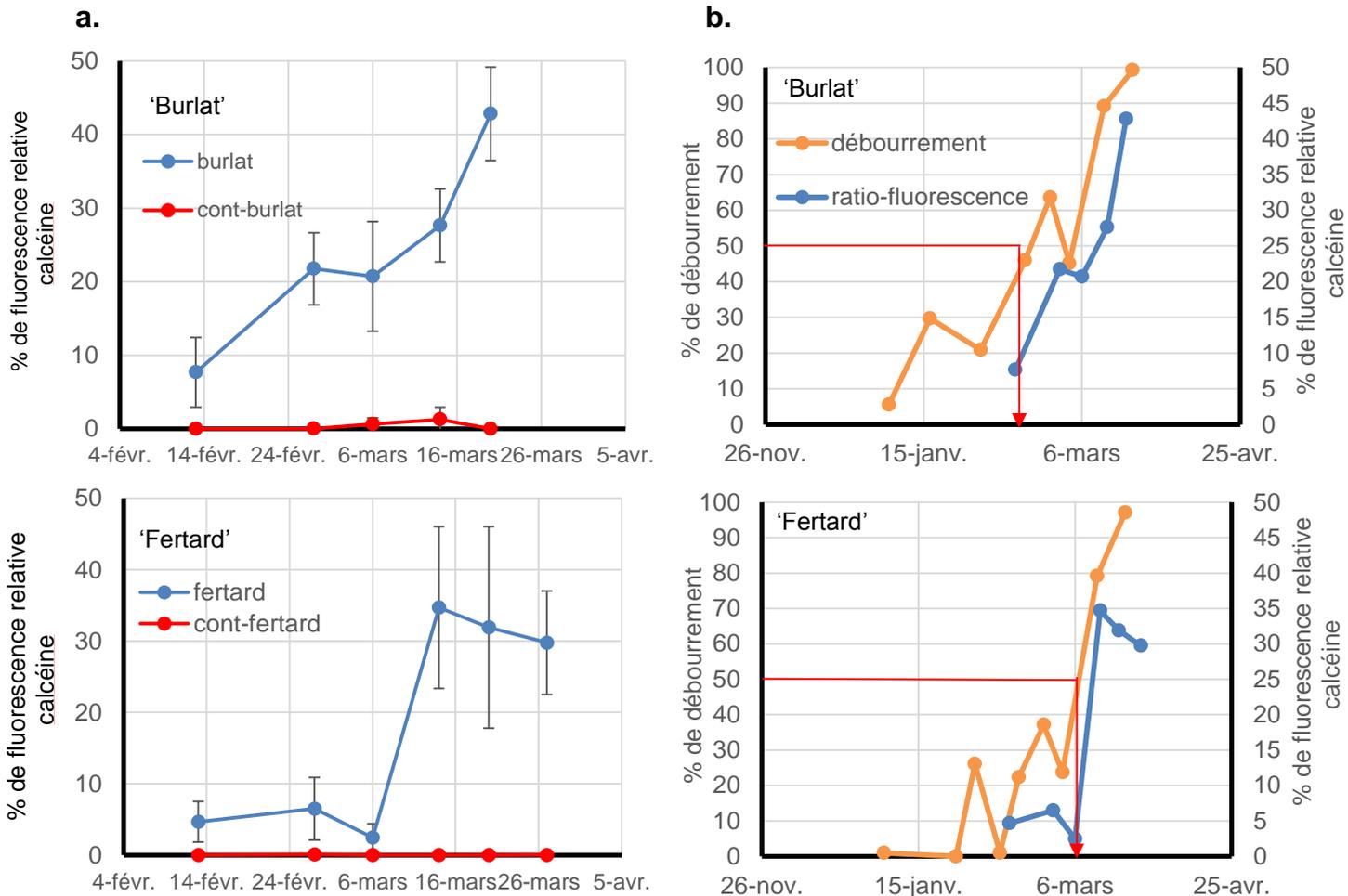


Figure 17 : a. Représentation graphique de la fluorescence relative pour les variétés 'Burlat' et 'Fertard' ; b. regroupement des données de fluorescence et des données de forçage pour 'Burlat' et 'Fertard', avec la mise en avant des 50 % de débourrement croisé avec la date de levée de dormance (flèche rouge).

3.2. Visualisation des dépôts de callose par le bleu d'aniline

Afin d'explorer la dynamique des dépôts de callose au cours de la dormance, nous avons utilisé du bleu d'aniline pour observer la présence de callose au niveau de bourgeon floraux à plusieurs stades de dormance chez la variété 'Fertard'. Les résultats montrent que le marquage au bleu d'aniline se localise principalement au niveau du phloème (fig18-19), avec un signal permettant d'identifier les éléments caractéristiques des cellules phloémiennes que sont les cribles (deux petites barrettes en vis-à-vis transversal) et les pores latéraux (ponctuation tout le long sur la partie longitudinale des cellules) (fig18.b). Ces résultats suggèrent la présence importante de callose au niveau des vaisseaux conducteurs du bourgeon au cours de la dormance. Les observations présentées en figures 19 et 20 présentent un signal bleu d'aniline (cyan) qui lui est propre et se démarquant de l'émission du bleu sombre de l'autofluorescence (annexe4).

Deux zones d'intérêt ont été observées plus en détail (fig19) : la base du bourgeon et la base des ébauches florales, repérées en lumière blanche (fig19). La fluorescence du bleu d'aniline est observée de façon constante au niveau des vaisseaux conducteurs à la base du bourgeon entre les quatre coupes (22 février au 29 mars, fig19.e-h). Au contraire, à la base des futurs pédoncules, la fluorescence observable diminue entre février et fin mars (fig18, fig19.i-l). On constate en effet de la fluorescence aussi bien sur le crible qu'au niveau des pores latéraux des cellules du phloème des cellules du bourgeon dormant (fig18.a-b) tandis qu'en sortie de dormance, seul le signal sur le crible est conservé (fig18.c-d).

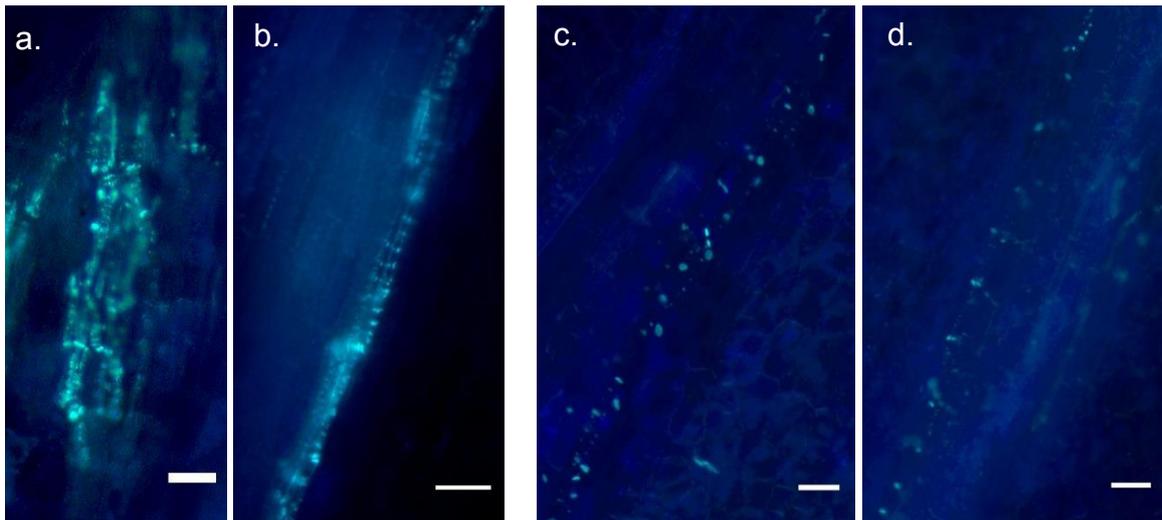


Figure 18 : Signal du bleu d'aniline (cyan) sur des coupes de 50 µm de la variété 'Fertard' observation à la base des ébauches florales. a. 1-mars ; b. 7-mars ; c. et d. 29-mars

3.3. Visualisation des dépôts de callose par immuno-fluorescence

Pour confirmer les résultats obtenus avec le bleu d'aniline au niveau de la base des ébauches florales, nous avons effectué des observations de callose en immunomarquage. Les premières analyses ont montré un marquage au niveau des tissus conducteurs (fig20.e-h), avec un marquage caractéristique des cribles et des pores latéraux des cellules du phloème, ce qui valide les résultats de marquage au bleu d'aniline (fig19.i-l). De la même façon, le signal fluorescent sur la partie longitudinale de la cellule est plus faible sur les coupes de bourgeons en sortie de dormance (fig20.h) que sur les coupes de bourgeons dormants (fig20.e-f). Par ailleurs, la détection par immuno-fluorescence a permis d'observer un signal dans le parenchyme, observé sous la forme de petites barrettes en vis-à-vis avec une légère perte de fluorescence au centre (fig20.a-d). Ce marquage dans le parenchyme est constant au cours de la dormance (fig20.a-d). Ces résultats sont appuyés par un contrôle technique sans ACII (annexe4).

Figure 19 : Signal du marquage en bleu d'aniline (cyan) au cours du temps sur deux zones distinctes de la base du bourgeon e.f.g.h. et à la base des ébauches florales i.j.k.l. Ces zones sont montrées en lumière blanche a.b.c.d. les rectangles rouges représentant la zone observée, a.1 est la zone observée en e., a.2 en i. respectivement la même chose pour les dates suivantes. Coupes 'Fertard' 50µm. Barre échelle a.b.c.d. 100µm ; e.f.a.h.i.i.k.l. 20µm.

	22 FEVRIER 2017	01 MARS 2017	16 MARS 2017	29 MARS 2017
Repère en lumière blanche	<p>a.</p>	<p>b.</p>	<p>c.</p>	<p>d.</p>
Marquage bleu aniline à la base du bourgeon	<p>e.</p>	<p>f.</p>	<p>g.</p>	<p>h.</p>
Marquage bleu d'aniline au niveau du futur pédoncule	<p>i.</p>	<p>j.</p>	<p>k.</p>	<p>l.</p>

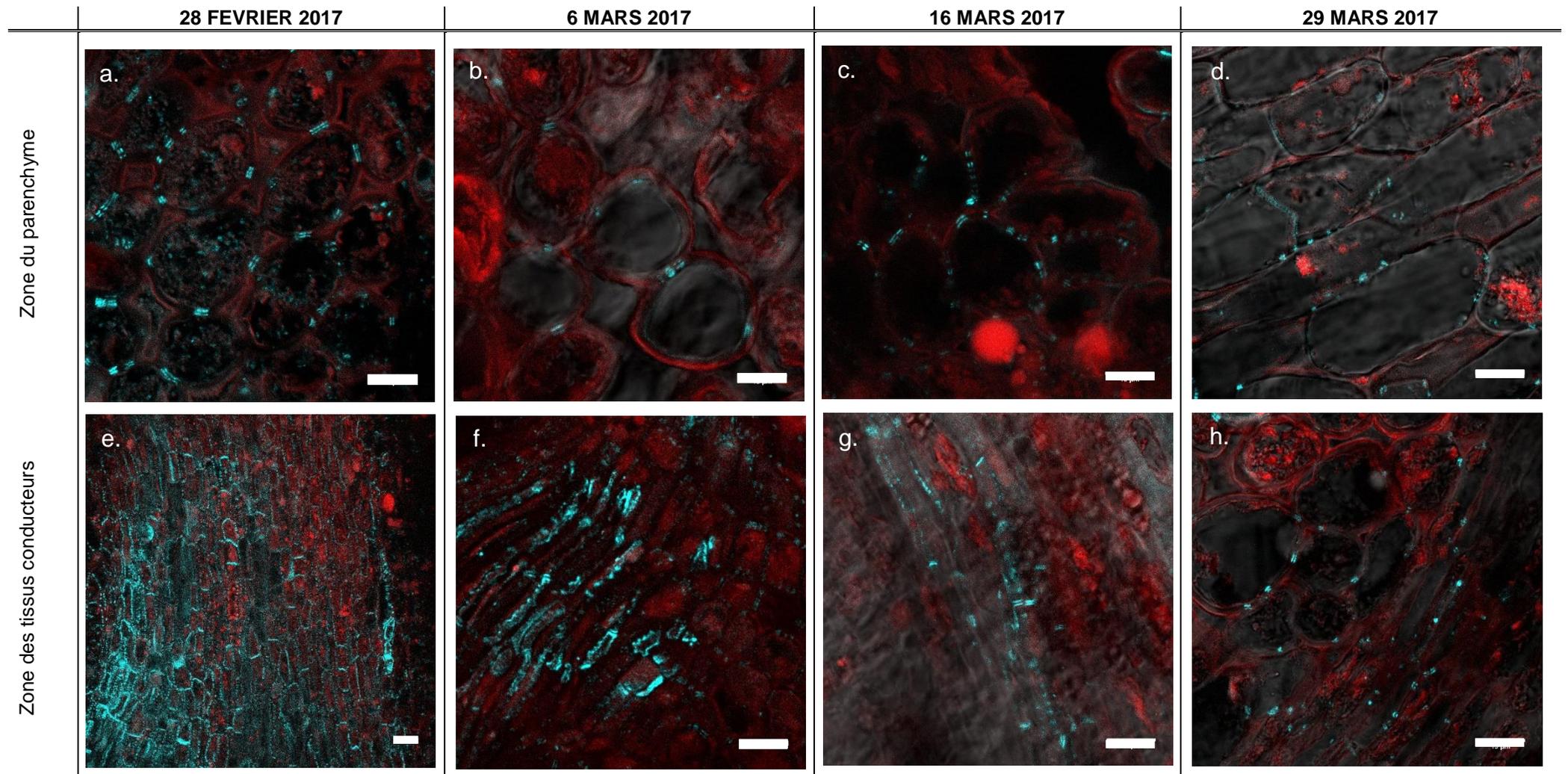


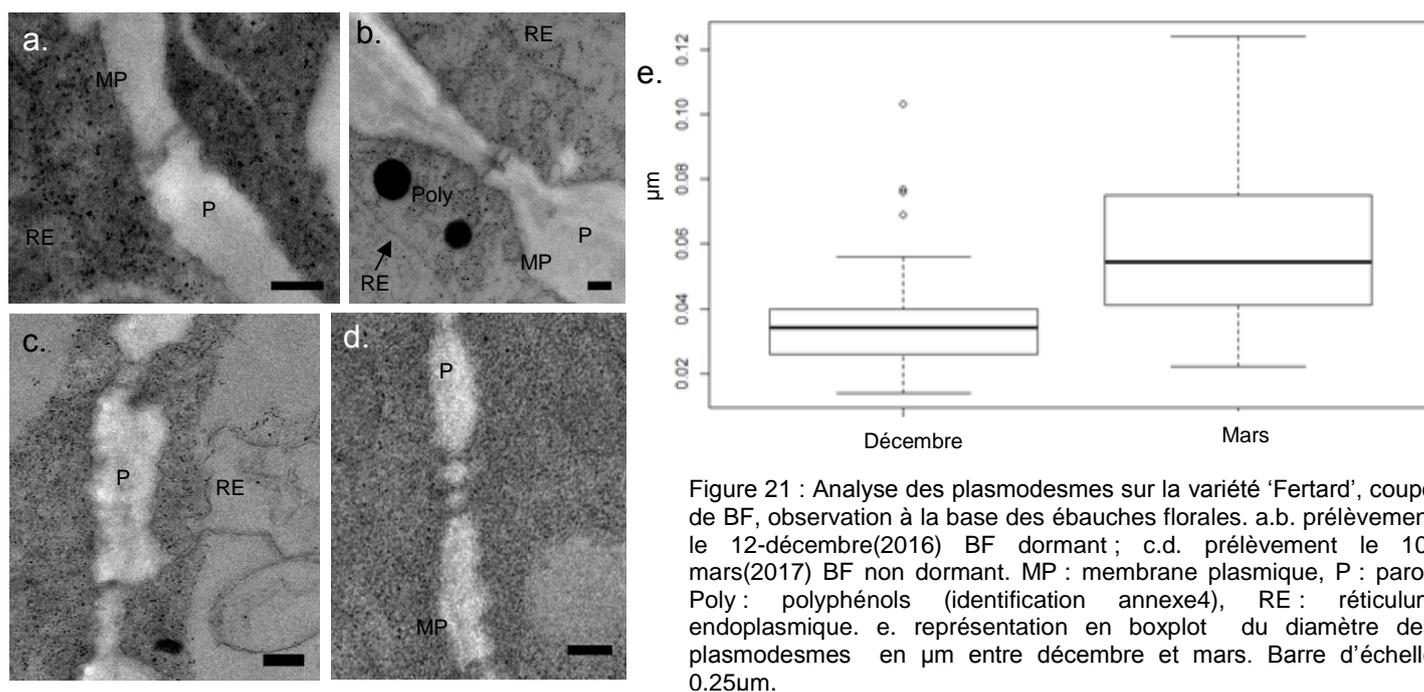
Figure 20 : Signal de l'Alexa 405 en cyan, autofluorescence en rouge, au cours du temps sur des coupes de 50 μ m chez 'Fertard'. Observation de deux tissus distincts l'un dans le parenchyme médullaire du bourgeon a.d.c.d. et l'autre dans le tissu vasculaire à la base des ébauches florales e.f.g.h. Barre d'échelle 20 μ m

3.4. Observation des bourgeons en ultra-structure

Suite aux observations de la perte du signal fluorescence au niveau des ébauches florales au cours de la dormance, nous avons exploré ces zones au microscope électronique à transmission (MET) afin d'identifier les différences potentielles des structures cellulaires au cours de la dormance.

3.4.1. Observation des plasmodesmes

De précédentes études ont montré que les plasmodesmes observés au microscope électronique à transmission avaient des structures différentes entre stades dormants et non dormants (Rinne et al., 2011). Nous avons donc cherché à caractériser les plasmodesmes des bourgeons floraux de cerisier (fig21), notamment en observant leur forme. Les observations suggèrent que les plasmodesmes des bourgeons dormants (fig21.a-b) sont plus étroits que les plasmodesmes des cellules de bourgeons non dormants (fig21.c-d), ce qui a été confirmé par les mesures de leur largeur (p -value=8.879e-16, $N=30$, fig21.e). De plus, une évolution de la forme des plasmodesmes est notable, avec des plasmodesmes ramifiés dans les cellules de bourgeons dormants (fig21.a-b) tandis qu'ils sont simples après la levée de dormance (fig21.c-d).



3.4.2. Parois et structures cellulaire

L'analyse des images au MET a révélé des différences notables sur les structures cellulaires entre bourgeons dormants et non dormants. L'élément le plus frappant est l'évolution de la paroi : très épaisse dans les coupes de bourgeons dormants (fig22.a) et plus fine après la sortie de dormance (fig22.b), avec une différence d'épaisseur significative (fig22.c ; p value < 2.2×10^{-16} , $N=30$). De plus, des lamelles de subérine (fig23.b) et des espaces intercellulaires importants (fig22.a) ne sont observés qu'au cours de la dormance.

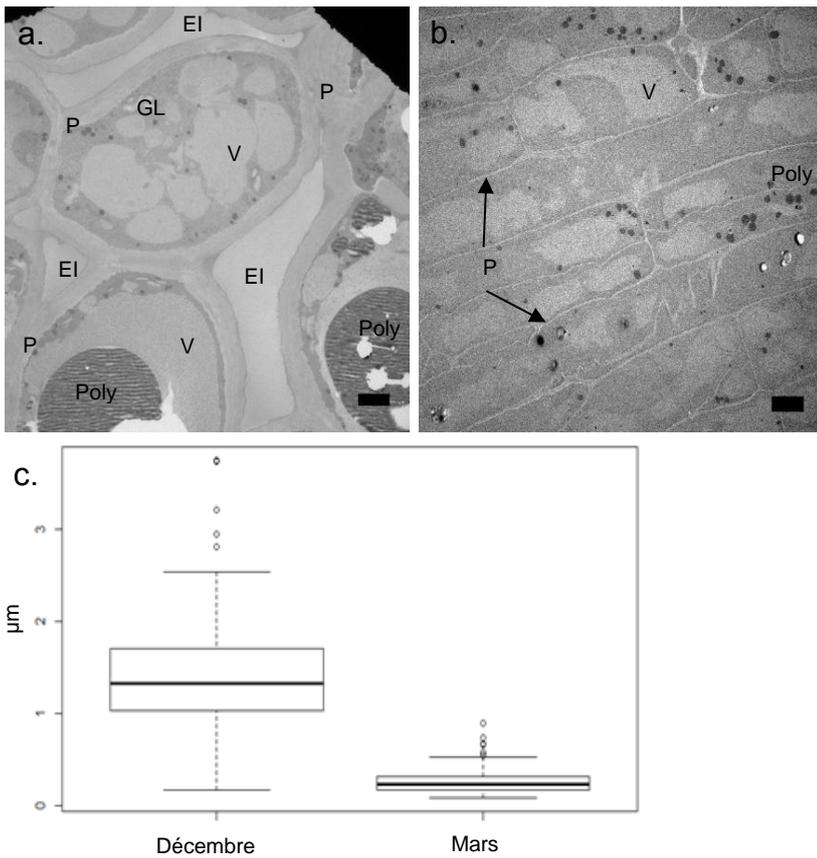


Figure 22 : Analyse de la paroi chez 'Fertard', coupes de BF observation à la base des ébauches florales. a. prélèvement du 12-décembre, b. prélèvement du 10-mars. c. représentation en boxplot du diamètre de la paroi en μm entre décembre et mars. EI : espace interstitiel, V : vacuole, GL : gouttelette lipidique. Barre d'échelle 3 μm .

On constate également un taux très important de polyphénols et de gouttelettes lipidiques (fig22.a), qui suggèrent une quantité importante de réserves cellulaires en dormance. En dernier lieu, on a aussi pu distinguer dans le futur pédoncule en dormance profonde (décembre) des cellules de tissus conducteurs en formation (protoxylème, fig23.a et protophloème, fig23.b) tandis que les cellules des tissus conducteurs sont nettement formées et fonctionnelles après la sortie de dormance (fig23.c-d).

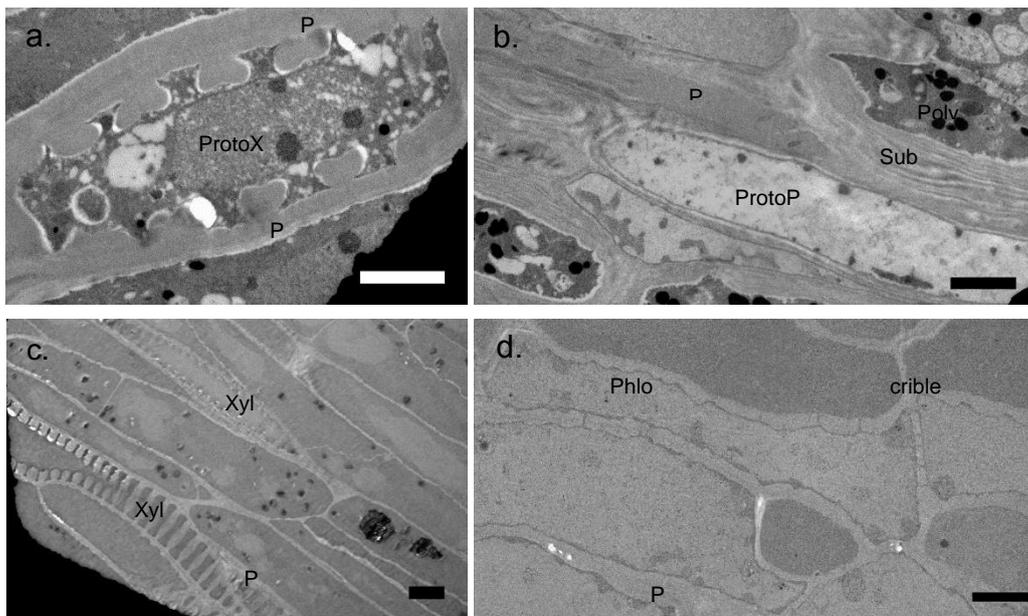


Figure 23 : Analyse des tissus conducteurs chez 'Fertard' coupe de BF observation à la base des ébauches florales. a.b. prélèvements du 12-décembre. c.d. prélèvement du 10-mars
ProtoX : protoxylème, ProtoP : protophloème, Xyl : xylème, Phlo : phloème, cribles ; plaque criblée. Barre d'échelle 3 μm .

3.5. Profils d'expression de gènes d'intérêt

Afin d'approfondir l'étude des mécanismes impliqués dans la dormance, une recherche dans la littérature et base de données a permis d'identifier des gènes candidats : biosynthèse (callose synthase) et dégradation (Glycosyl hydrolases-17, *GH17*) de la callose, gènes impliqués dans les mécanismes du système pariétal, (HRGP, celluloses synthases, β -glucosidase, pectinesterase et pectinase). Au total, 122 gènes ont été identifiés : 11 callose synthases, 60 *GH17*, et 51 gènes codant pour la synthèse et la dégradation des substances pariétales.

À partir de la liste initiale de gènes candidats, une sélection a été réalisée sur le niveau d'expression et la dynamique de l'expression au cours de la dormance. Nous avons ainsi retenu une callose-synthase, 11 *GH17* et 14 gènes liés à la synthèse et dégradation des substances pariétales (annexe5) pour une analyse du profil d'expression dans les bourgeons floraux des variétés 'Burlat' et 'Regina' au cours de la dormance.

L'analyse globale des profils d'expression des gènes par une heat map (annexe6) a permis d'identifier quatre principaux profils d'expression au cours de la dormance (fig24) :

- 1) les gènes exprimés uniquement avant l'entrée en dormance
- 2) les gènes qui ont une expression spécifique pendant la dormance
- 3) les gènes exprimés en sortie de dormance
- 4) les gènes dont l'expression est inhibée lors de la dormance.

On retrouve des profils similaires pour les deux variétés avec parfois des décalages des expressions dans le temps, correspondant aux différences de dates de levée de dormance entre les deux variétés (annexe6 heat maps).

La callose synthase présente un profil de type 1, avec une expression plus importante avant l'entrée en dormance tandis que les gènes impliqués dans la dégradation de la callose (*GH17*) sont caractérisés par deux profils : une expression plus forte en sortie de dormance (profil 3) et inhibés spécifiquement au cours de la dormance (profil 4, fig24). Ces résultats suggèrent des dynamiques différentes dans la sécrétion et la dégradation de callose, avec des événements qui sont parfois très ponctuels, comme par exemple les pics d'expression de *GH17-H* et *GH17-I* spécifiques de la reprise de croissance en mars (annexe6) ou des activations d'expression successives à la sortie de dormance (*GH17-B/39/44*).

Pour les gènes potentiellement impliqués dans les structures pariétales, l'expression de plusieurs gènes avec le profil 1 peuvent correspondre à une activité prévisionnelle de la période hivernale, avec une mise en place de cellulose (*CelluloS-B*, annexe 6), de pectine (*PECTINESTERASE-A*, annexe6) au niveau des parois, voire la sécrétion de cire (*KCS-2*). Plusieurs gènes de réponse à des stress froids sont exprimés au cours de la dormance (profil 2), notamment pour le renforcement et la restructuration pariétal (gène *CWPC*, gènes *XTH*, fig24), et vraisemblablement des saturations protéiques au niveau des plasmodesmes (gènes *PDLP*).

Enfin, en sortie de dormance (profil 3), les *pectinases* et β -glucosidases (fig24) sont fortement exprimées, suggérant une activité importante de dégradation de certaines structures pariétales.

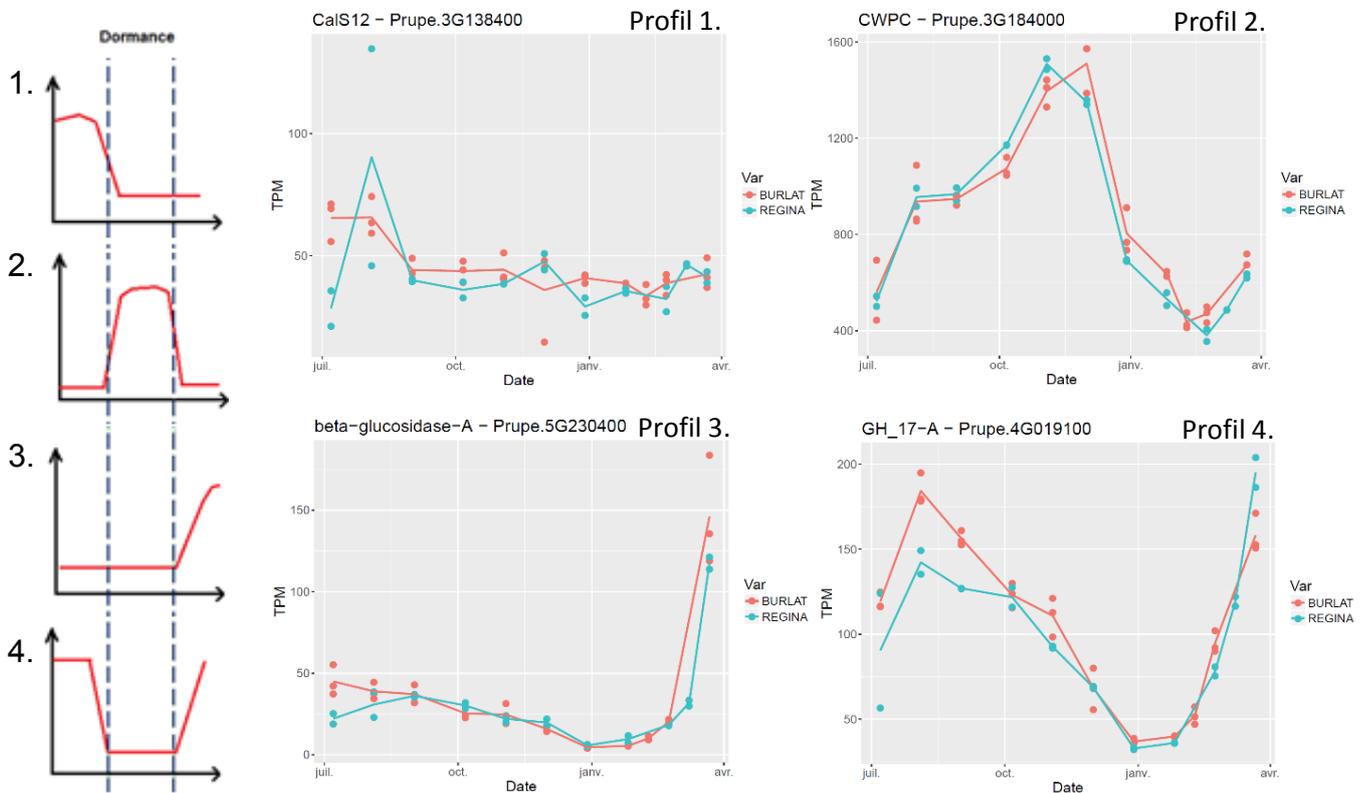


Figure 24 : Schéma des profils types, représentant le niveau d'expression du gène au cours du temps avec la période de dormance délimitée par les tirés bleus. Profils illustrés par 4 graphiques représentant chacun un gène au cours du temps avec son expression TPM (nombre de transcrit par million). *CalS12* pour le profil 1. ; *CWPC* pour le profil 2. ; β -glucosidase-A pour le profil 3 et *GH17-A* pour le profil 4.

4. Discussion et perspectives

Dans cette discussion nous ferons un premier point sur les protocoles utilisés, le premier but de ce travail étant leur mise au point, notamment leurs limites et les points à améliorer. Dans un deuxième point nous discuterons les observations en microscopie et les profils d'expression génétique, tout particulièrement les dynamiques d'intérêt à mettre en évidence.

4.1. Mise au point des protocoles

Suivi de la capacité de transport

Afin d'étudier l'arrêt et la reprise des communications intercellulaires, nous avons quantifié la fluorescence liée au transport de calcéine entre le rameau et les bourgeons à plusieurs dates au cours de la dormance, tel que proposé par Rinne et al. (2011). Les résultats ont montré que cette technique permet le phénotypage de la levée de l'endodormance. Elle est homogène et permet l'observation d'un grand nombre de bourgeons. Néanmoins à l'avenir il faudra penser à définir plus précisément et de façon systématique sur toutes les observations la longueur d'onde d'excitation, le temps d'exposition et l'intensité de la lampe. Dans le cadre de l'étude, il a également été observé une saturation de la solution à 0.1 M (dépôts de poudre dans la solution), ce qui peut engendrer des problèmes de fiabilité dans la concentration et peut potentiellement engendrer un stress sur les échantillons.

Observations en ultra-structure

Plusieurs protocoles ont été testés (annexes 2-3) en variant les temps d'imprégnations, l'imprégnation sous vide et le type de résine. *In fine*, il a été montré que le paramètre déterminant pour obtenir des blocs utilisables est l'épaisseur de départ de la coupe de bourgeon. Par exemple, nos résultats montrent qu'il est possible d'inclure en HM20, résine qui a posé des problèmes pour l'imprégnation, mais seulement pour des coupes inférieures à 100 µm. Concernant la résine LR white, elle peut être utilisée pour inclure des coupes de 500 µm, mais nécessite des temps d'imprégnation sous vide, ce qui peut poser des problèmes de déshydratation des coupes. De plus, les coupes ainsi obtenues restent extrêmement fragiles sous le canon à électrons du MET. Enfin, les optimisations ont montré que la résine SPURR, pour laquelle le protocole est le moins complexe (annexe 2), présente également le plus d'avantages aussi bien pour la pénétration des tissus que pour la qualité des photos au MET.

4.2. Etude des processus impliqués dans les communications cellulaires au cours de la dormance

Par leur action sur les plasmodesmes, la callose aurait un rôle clé dans les mécanismes liés à la dormance du bourgeon (Vatén et al. 2011 ; Aloni et Peterson 1991 ; 1997 ; Rinne et al. 2001). Elle influe sur les échanges entre cellules, ce travail cherche à faire une première illustration de son rôle lors de la dormance chez le cerisier doux.

L'observation du transport de la calcéine se révèle être un nouveau moyen de phénotypage qui peut être corrélé aux données de forçage, mais aussi un moyen de montrer la reprise d'activité des transporteurs dans la plante. On peut faire l'hypothèse que le transport de calcéine illustre également la reprise des phénomènes de chargement et de déchargement du phloème (phénomène mis en avant par Pfautsch et al. 2015). Ces processus sont bloqués lors de la dormance par tous les mécanismes d'isolement et de protection des cellules et organes mis en place par la plante, comme les dépôts de callose au niveau du phloème (Patel et al. 2013). Les résultats étayent l'argument en faveur d'une réouverture des plasmodesmes à la levée de dormance, permettant une remontée de la sève brute dans le bourgeon, marqué ici par un signal fluorescent plus important, comme proposé par Rinne en 2011.

Les différences observées sur les cellules du phloème au niveau des futurs pédoncules entre bourgeons dormants et non dormants sont similaires aux observations réalisées sur des rameaux dormant de *Lanena* âgée de 2-3 ans, par Patel et al. en 2013 et suggèrent que la présence de callose pourrait être impliquée dans la levée de dormance et dans la reprise des transports. Toutefois, cette dynamique n'est mise en évidence qu'à la base des ébauches florales tandis qu'un signal constant est maintenu à la base des bourgeons. Ce marquage ne possédant pas de dynamique peut aussi être des dépôts de callose constitutifs ou avec une dynamique de régulation trop fine pour cette échelle de lecture. Néanmoins ces deux tissus, à la base du bourgeon et à la base des ébauches florales n'ont pas le même potentiel de croissance après la levée de dormance. A ce titre, la perte de signal au niveau du pédoncule peut être liée au fait qu'en sortie de dormance, le pédoncule présente une élongation très rapide, de 39 à 48 mm observée pour 'Fertard' et 'Burlat', dès la levée de dormance. Nous pouvons faire l'hypothèse que les dépôts de callose sont plus rapidement dégradés au cours des processus de division et d'élongation tandis qu'ils restent présents et visibles dans les zones moins actives (base du bourgeon). Toutefois, la base du bourgeon est la zone de passage de sève entre le bourgeon et le rameau lors de la reprise de croissance, ce qui suggère que le signal callose observé n'est pas directement corrélé avec la capacité de transport. Il est donc possible que la dynamique des dépôts de callose potentiellement liée à la dormance ne soit pas observable. La complexité des dynamiques de synthèse et de dégradation de la callose est également révélée par les différents profils d'expression des gènes impliqués dans ces processus. En effet, plusieurs gènes de dégradation de la callose (*GH17*) sont exprimés en sortie de dormance, semblables aux résultats de Rinne et al. (2001) tandis que d'autres *GH17* présentent des profils d'expression différents.

Les résultats n'ont pas permis d'observer les dépôts de callose directement au niveau des plasmodesmes mais ont mis en évidence des différences de diamètre des plasmodesmes selon les stades de dormance. Cette observation validerait l'hypothèse de départ que la forme des plasmodesmes contrôle les capacités de communications de cellule à cellule au cours de la dormance, tels que suggérés par le signal calcéine. Il est possible que ces changements drastiques sur les plasmodesmes entraînent une réduction ou un blocage du transport intercellulaire des matériaux et de la communication intercellulaire, (Jian et al. 1997). Néanmoins, cette hypothèse est actuellement remise en question, car il a été démontré qu'un plasmodesme avec un petit manchon

cytoplasmique posséderait parfois une activité égale voire plus importante qu'un plasmodesme avec un manchon cytoplasmique plus grand (Nicolas et al. 2017).

Dans la continuité de ce travail, il serait intéressant d'observer les capacités de transport et la présence de callose dès l'entrée en dormance. De plus, une observation au MET des dépôts de callose au niveau des plasmodesmes pourrait être réalisée par un immunomarquage aux particules d'or colloïdale.

4.3. Modifications des structures cellulaires au cours de la dormance

Les observations au MET ont également permis d'identifier des différences de structures cellulaires entre bourgeons dormants et non dormants. Tout d'abord, la présence de protoxylème et de protophloème dans les BF dormants suggèrent qu'il y a formation de nouveaux tissus conducteurs et que le bourgeon dormant n'est donc pas inactif (Andreini 2012). Les bourgeons dormants sont également caractérisés par des parois plus épaisses offrant potentiellement une protection mécanique contre les pressions abiotiques. Nos résultats montrent, plusieurs gènes liés à la production de lipides pour un renforcement pariétal de réponse à des stress froid sont d'ailleurs exprimés en entrée en dormance. Certains éléments des parois seraient ensuite dégradés en sortie de dormance, en lien avec l'activation de l'expression des gènes de dégradation de la pectine et de la cellulose. La présence d'éléments de réserve tels que les gouttelettes lipidiques et polyphénols a été observé sur bourgeons dormants de peuplier (Jian et al. 1997), qui peuvent servir de protection, ou être réallouées en sortie de dormance. C'est par exemple le cas de la subérine dont la dégradation produit lipides, pectine, polyosides et glucides. Ces éléments viennent illustrer la complexité des mécanismes cellulaires des bourgeons lors de la dormance.

Conclusion

Cette étude est une première approche pour l'observation des capacités de transport et de la callose dans les bourgeons de cerisier au cours de la dormance. Les résultats ont validé une nouvelle approche du phénotypage et ont permis d'obtenir les premiers éléments des mécanismes mis en place au niveau cellulaire lors de la dormance. La callose était la cible clé de cette étude mais les observations ont ouvert de nouvelles voies d'exploration pour les mécanismes liés à la dormance.

La répétition de ces observations à différentes échelles tout au long de la dormance et sur plusieurs variétés sélectionnées pour leur date de levée de dormance sera le meilleur moyen pour approfondir les pistes de réflexion présentées dans ce travail.

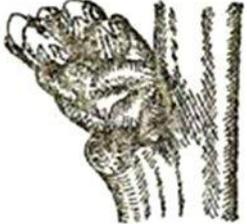
Bibliographies

- AART JE Van Bel (1990) Xylem-Phloem Exchange Via the Rays: The Undervalued Route of Transport. *J Exp Bot* 41:631–644. doi: 10.1093/jxb/41.6.631
- Aloni R, Peterson CA (1991) Seasonal Changes in Callose Levels and Fluorescein Translocation in the Phloem of *Vitis Vinifera* L. *IAWA Journal* 12:223–234. doi: 10.1163/22941932-90001247
- Aloni R, Peterson CA (1997) Auxin promotes dormancy callose removal from the phloem of *Magnolia kobus* and callose accumulation and earlywood vessel differentiation in *Quercus robur*. *J Plant Res* 110:37. doi: 10.1007/BF02506841
- Andreini L, Viti R, Bartolini S, et al (2012) The relationship between xylem differentiation and dormancy evolution in apricot flower buds (*Prunus armeniaca* L.): the influence of environmental conditions in two Mediterranean areas. *Trees* 26:919–928. doi: 10.1007/s00468-011-0668-1
- Botha CEJ, Cross RHM, Bel AJE van, Peter CI (2000) Phloem loading in the sucrose-export-defective (SXD-1) mutant maize is limited by callose deposition at plasmodesmata in bundle sheath—vascular parenchyma interface. *Protoplasma* 214:65–72. doi: 10.1007/BF02524263
- Campoy JA, Ruiz D, Egea J (2011) Dormancy in temperate fruit trees in a global warming context: A review. *Scientia Horticulturae* 130:357–372. doi: 10.1016/j.scienta.2011.07.011
- Castède S, Campoy JA, Dantec LL, et al (2015) Mapping of Candidate Genes Involved in Bud Dormancy and Flowering Time in Sweet Cherry (*Prunus avium*). *PLOS ONE* 10:e0143250. doi: 10.1371/journal.pone.0143250
- Chen X-Y, Kim J-Y (2009) Callose synthesis in higher plants. *Plant Signaling & Behavior* 4:489–492. doi: 10.4161/psb.4.6.8359
- Ehlers K, Kollmann R (2001) Primary and secondary plasmodesmata: structure, origin, and functioning. *Protoplasma* 216:1. doi: 10.1007/BF02680127
- Electron Microscopy Sciences. <https://www.emsdiasum.com/microscopy/>. Accessed 13 Aug 2017c
- 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. Phdthesis, Université d'Angers
- Grison MS, Brocard L, Fouillen L, et al (2015) Specific Membrane Lipid Composition Is Important for Plasmodesmata Function in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* 27:1228–1250. doi: 10.1105/tpc.114.135731
- Jian L, Li PH, Sun L, Chen THH (1997) Alterations in ultrastructure and subcellular localization of Ca²⁺ in poplar apical bud cells during the induction of dormancy. *J Exp Bot* 48:1195–1207. doi: 10.1093/jxb/48.6.1195
- Krabel D, Eschrich W, Wirth S, Wolf G (1993) Callase-(1,3-β-d-glucanase) activity during spring reactivation in deciduous trees. *Plant Science* 93:19–23. doi: 10.1016/0168-9452(93)90030-4
- Lang GA (1987) Endo-, para-, and ecodormancy: Physiological terminology and classification for dormancy research. *HortScience* 22:371–377.
- Levy, A., & Epel, B. L. (2009). Cytology of the (1, 3)-β-glucan (callose) in plasmodesmata and sieve plate pores. *Chemistry, biochemistry and biology of (1, 3)-beta glucans and related polysaccharides*. Academic, San Diego, 439-463.
- Lichou J, Edin M, Tronel C, Saunier R (1990) *Le cerisier : la cerise de table*. Ctifl/Ctre Techn.Internat, Paris
- Loescher WH (1987) Physiology and metabolism of sugar alcohols in higher plants. *Physiologia Plantarum* 70:553–557. doi: 10.1111/j.1399-3054.1987.tb02857.x
- Marouf A, Reynaud J (2007) *La botanique de A à Z: 1 662 définitions*. Dunod
- Meyer S, Reeb C, Bosdeveix R (2008) *Botanique: biologie et physiologie végétales*. Maloine
- Milcent J-P *Tela Botanica - Accueil*. In: *Tela Botanica*. <http://www.tela-botanica.org/site:accueil>. Accessed 13 Aug 2017

- Moisselin J-M, Schneider M, Canellas C (2002) Climate change over France during the 20th century; a study of long-term homogenized data of temperature and rainfall. <http://hdl.handle.net/2042/36233>.
- Nabors MW (2008) *Biologie végétale: structures, fonctionnement, écologie et biotechnologies*. Pearson Education. Pearson Education chap 11 pp 246.
- Olsen JE (2010) Light and temperature sensing and signaling in induction of bud dormancy in woody plants. *Plant Mol Biol* 73:37–47. doi: 10.1007/s11103-010-9620-9
- Otero S, Helariutta Y, Benitez-Alfonso Y (2016) Symplastic communication in organ formation and tissue patterning. *Current Opinion in Plant Biology* 29:21–28. doi: 10.1016/j.pbi.2015.10.007
- Patel VR, Pathak N, Rao KS (2013) Effect of Local Heating on Dormant Cambial Cells in the Branches of *Lannea coromandelica* (Houtt.) Merr. *Indian Forester* 139:731–736.
- Patrick JW (1997) PHLOEM UNLOADING: Sieve Element Unloading and Post-Sieve Element Transport. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48:191–222. doi: 10.1146/annurev.arplant.48.1.191
- Pfautsch S, Renard J, Tjoelker MG, Salih A (2015) Phloem as Capacitor: Radial Transfer of Water into Xylem of Tree Stems Occurs via Symplastic Transport in Ray Parenchyma. *Plant Physiology* 167:963–971. doi: 10.1104/pp.114.254581
- Piršelová B, Matušíková I (2013) Callose: the plant cell wall polysaccharide with multiple biological functions. *Acta Physiol Plant* 35:635–644. doi: 10.1007/s11738-012-1103-y
- Rinne PLH, Kaikuranta PM, Van Der Schoot C (2001) The shoot apical meristem restores its symplasmic organization during chilling-induced release from dormancy. *The Plant Journal* 26:249–264. doi: 10.1046/j.1365-313X.2001.01022.x
- Rinne PLH, Welling A, Vahala J, et al (2011) Chilling of Dormant Buds Hyperinduces FLOWERING LOCUS T and Recruits GA-Inducible 1,3- β -Glucanases to Reopen Signal Conduits and Release Dormancy in *Populus*. *The Plant Cell Online* 23:130–146. doi: 10.1105/tpc.110.081307
- Rinne PL, van der Schoot C (1998) Symplasmic fields in the tunica of the shoot apical meristem coordinate morphogenetic events. *Development* 125:1477–1485.
- Robert D, Roland J-C (1998) *Biologie végétale, tome 1. Organisation cellulaire*, Nouv. éd. Doin Editions, Vélizy, France
- Rohde A, Bhalerao RP (2007) Plant dormancy in the perennial context. *Trends in Plant Science* 12:217–223. doi: 10.1016/j.tplants.2007.03.012
- Ruonala R, Rinne PLH, Kangasjärvi J, Schoot C van der (2008) CENL1 Expression in the Rib Meristem Affects Stem Elongation and the Transition to Dormancy in *Populus*. *The Plant Cell Online* 20:59–74. doi: 10.1105/tpc.107.056721
- Sager R, Lee J-Y (2014) Plasmodesmata in integrated cell signalling: insights from development and environmental signals and stresses. *J Exp Bot* 65:6337–6358. doi: 10.1093/jxb/eru365
- Sigma-Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/france.html>. Accessed 13 Aug 2017
- Sood S, Vyas D, Nagar PK (2006) Physiological and biochemical studies during flower development in two rose species. *Scientia Horticulturae* 108:390–396. doi: 10.1016/j.scienta.2006.02.012
- Tanino KK, Kalcsits L, Silim S, et al (2010) Temperature-driven plasticity in growth cessation and dormancy development in deciduous woody plants: a working hypothesis suggesting how molecular and cellular function is affected by temperature during dormancy induction. *Plant Mol Biol* 73:49–65. doi: 10.1007/s11103-010-9610-y
- Vatén A, Dettmer J, Wu S, et al (2011) Callose biosynthesis regulates symplastic trafficking during root development. *Dev Cell* 21:1144–1155. doi: 10.1016/j.devcel.2011.10.006
- Wj N, Ms G, S T, et al (2017) Architecture and permeability of post-cytokinesis plasmodesmata lacking cytoplasmic sleeves. *Nat Plants* 3:17082–17082. doi: 10.1038/nplants.2017.82
- Zavaliev R, Epel BL (2015) Imaging Callose at Plasmodesmata Using Aniline Blue: Quantitative Confocal Microscopy. In: *Plasmodesmata*. Humana Press, New York, NY, pp 105–119

Annexe 1

Phénologie d'un bouquet de mai :

 <p style="text-align: right;">A</p>	 <p style="text-align: right;">B</p>	 <p style="text-align: right;">C</p>	 <p style="text-align: right;">D</p>
<p>Bourgeon d'hiver Caractérise l'état de repos de l'arbre. Bourgeon entièrement brun, aigu et complètement fermé</p>	<p>Bourgeon gonflé Le bourgeon s'arrondit sensiblement et prend à son sommet une coloration vert clair.</p>	<p>Boutons visibles Les écailles du sommet s'écartent et laissent voir les boutons verts encore rassemblés.</p>	<p>Les boutons se séparent Les boutons se séparent entre eux, tout en restant enveloppés à leur base par les écailles du bourgeon, la pointe blanche de la corolle est visible</p>
 <p style="text-align: right;">E</p>	 <p style="text-align: right;">F</p>	 <p style="text-align: right;">G</p>	
<p>On voit les étamines Les premiers boutons s'ouvrent partiellement et laissent apparaître les étamines</p>	<p>Fleur ouverte Toutes les fleurs sont ouvertes; c'est la pleine floraison</p>	<p>Chute des pétales Les pétales flétrissent et commencent à tomber; les étamines s'enroulent.</p>	
 <p style="text-align: right;">H</p>	 <p style="text-align: right;">I</p>	 <p style="text-align: right;">J</p>	
<p>Nouaison Tous les pétales sont tombés; la base du calice commence à grossir, la nouaison a eu lieu</p>	<p>Le calice tombe La collerette du calice se dessèche, se détache et finit par tomber, laissant le petit fruit à nu</p>	<p>Jeune fruit Le jeune fruit grossit rapidement et prend bientôt sa forme normale</p>	

Annexe 2

Pour les blocs F(2)6 à F(2)10 et De F(9)42 à F(9)46 le protocole a été :

Date	Etape	Détaille	durée / étape	commentaires
F(1) le 13/12/2016 F(8) le 06/03/2017	Fixation	Tampon PFA 2,5% et gluta 2,5%	temps de réaliser toutes les coupes	Tampon PFA 2,5% et gluta 2,5%
	Dégazage séquence de vide	800 nbar	5 min	suivie d'une agitation énergique (à la main)
		700 nbar	5 min	""
		600 nbar	5 min	""
		500 nbar	5 min	""
		400 nbar	5 min	""
		300 nbar	5 min	remettre à 4°C (penser à préparer l'osmium)
F(1) le 13/12/2016 F(8) le 20/03/2017	Rinçage des coupes	3ml de tampon	10 min	Tampon phosphate 0,1M laissé en agitation (60rpm)
		3ml de tampon	10 min	
		3ml de tampon	10 min	
	Fixation dans l'osmium 2% final	2mL de volume final	45 min	1,25 de Tampon Phosphate 0,2M et 1,25 d'osmium 4%, en agitation
F(1) 20/03/2017	Rinçage de coupes	2 ml de tampon	10 min	Tampon phosphate 0,1M, laissé en agitation
		2 ml de tampon	2h	
		2 ml de tampon	10 min	
		3 ml H2O milliQ	10 min	laissé en agitation
		3 ml H2O milliQ	10 min	
		3 ml H2O milliQ	10 min	laissé à 4°C pour la nuit (mettre l'éthanol à 4°C)
F(1) et F(8) 27/03/2017	Déshydratation EtOH	30%	10min	sur agitateur plateau (60rpm)
		50%	""	""
		70%	""	""
		85%	""	""
		95%	""	""
		100%	30 min	""
		100%	1h (1h30)	x2 toujours sur agitateur plateau
	Imprégnation SPURR	25%	19h	En agitation sur plateau (60rpm)
28/03/2017		50%	10h	""
		75%	21h	""
29/03/2017		100%	24h	""
		100%	24h	mis en verre de montre pour évaporer tout solvant restant
30/03/2017				
31/03/2017	Polymérisation	100%	24h	Dans des gélules 0.0 ; à chaud 65°C
03/07/2017	Démoulage			

Annexe 3

Pour les blocs De F(7)30 à F(7)36 le protocole utilisé a été :

Date	Etape	Détaille	durée / étape	commentaires
06/02/2017	Dégazages	dans le fixateur	00:30	6 séquences de 5 min (800, 700, 600, 500, 400, 300 mbars)
	Fixation	4% PFA Tp Ph 0,1M pH 7.2		overnight, TA, shaker 90 rpm
07/02/2017	Dégazages	dans le fixateur	00:15	3 x 5 min, 300 mbars
	Rinçages	Tampon phosphate 0,1M pH 7.2	00:20	TA, shaker 90 rpm, 3 x 10 min
	Déshydratation	éthanol 30, 50, 70, 95	00:40	TA, shaker 90rpm, 4 x 10 min (éthanol au frigidaire depuis la veille)
		éthanol 100	01:30	TA, shaker 90rpm
		éthanol 100	01:00	
	Imprégnation	LRWhite 20% / éthanol 100	02:00	sous vide, 100 mbars, sans agiter / 3 mL par pilulier
		LRWhite 50% / éthanol 100	01:00	sous vide, 100 mbars, sans agiter / 3 mL par pilulier
		LRWhite 50% / éthanol 100	15:35	overnight, TA, shaker 90 rpm
08/02/2017		LRWhite 80% / éthanol 100	08:00	sous vide, 100 mbars, sans agiter / 3mL par pilulier évaporation et passage progressif de 80 à 100 %
		LRW 100% (bain n°1)	16:40	overnight, TA, shaker 90 rpm
09/02/2017		LRW 100% (bain n°2)	07:20	sous vide, 100 mbars, sans agiter / 3 mL par pilulier
		LRW 100% (bain n°3)	16:00	overnight, TA, shaker 90 rpm
10/02/2017		LRW 100% (bain n°3)	04:45	sous vide, 100 mbars, sans agiter / 3 mL par pilulier
	Inclusion			24h à 60°C & LRW + accélérateur à TA
13/02/2017	Démoulage			

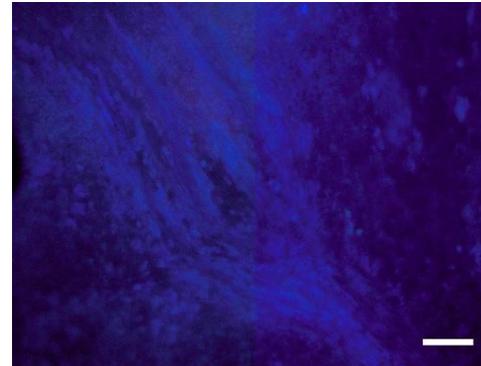
Annexe 4

CONTROLES TECHNIQUE

Visualisation des dépôts de callose au bleu aniline

Visualisation de l'**autofluorescence** (bleu sombre) des coupes de bourgeon (même traitement PFA 4%, tampon Phosphate 0.1M) ('Fertard') :

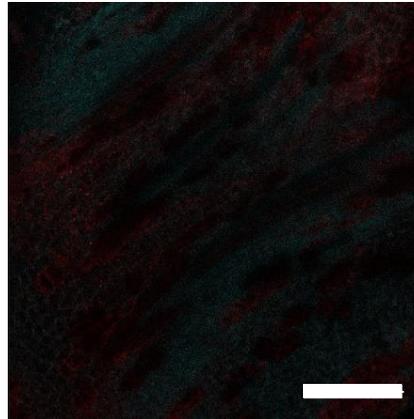
Base des ébauches florales



Lumière blanche barre d'échelle : 100µm
Fluorescence barre d'échelle : 20µm

Visualisation des dépôts de callose par immunomarquage

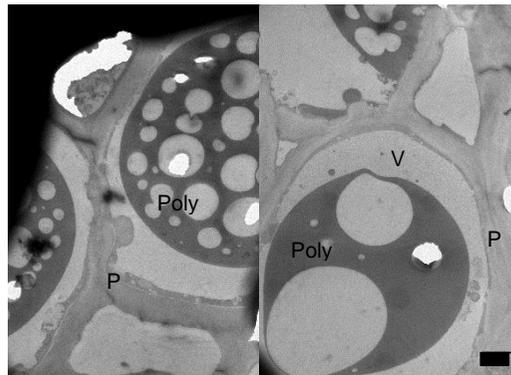
Test sans AC I :



Barre d'échelle : 20µm

Observation des bourgeons en ultra structure

Comparaison des polyphénols non osmié :



Barre d'échelle : 3µm

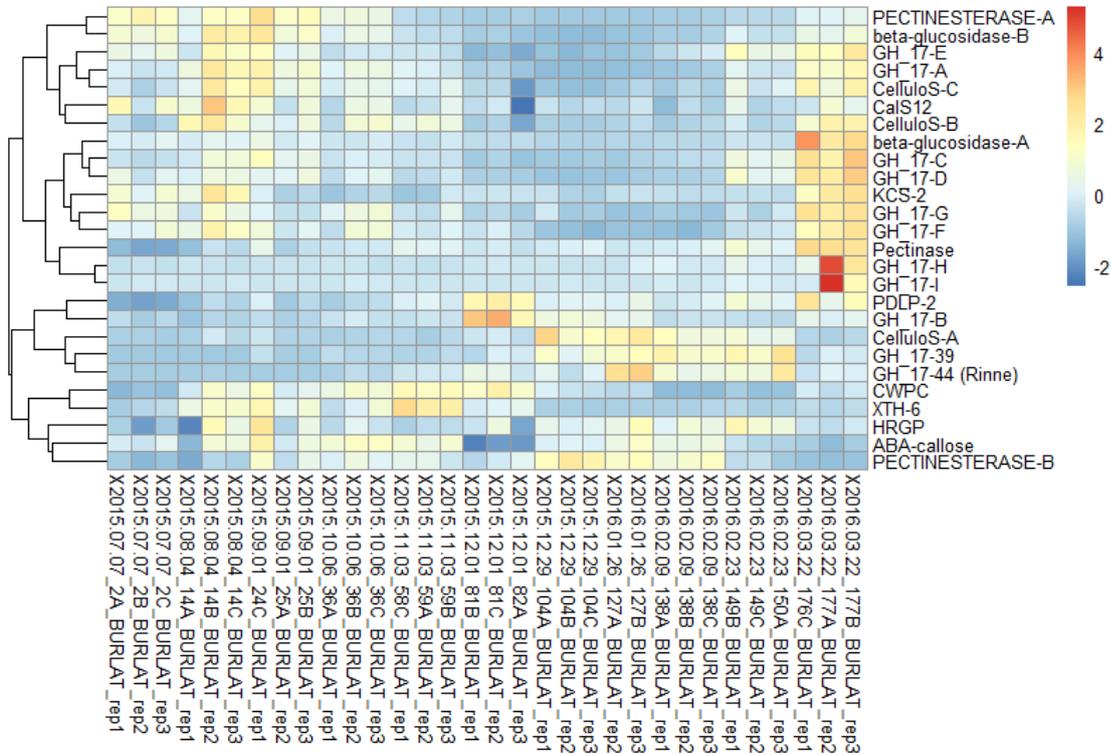
Annexe 5

Liste de l'ensemble des gènes candidats :

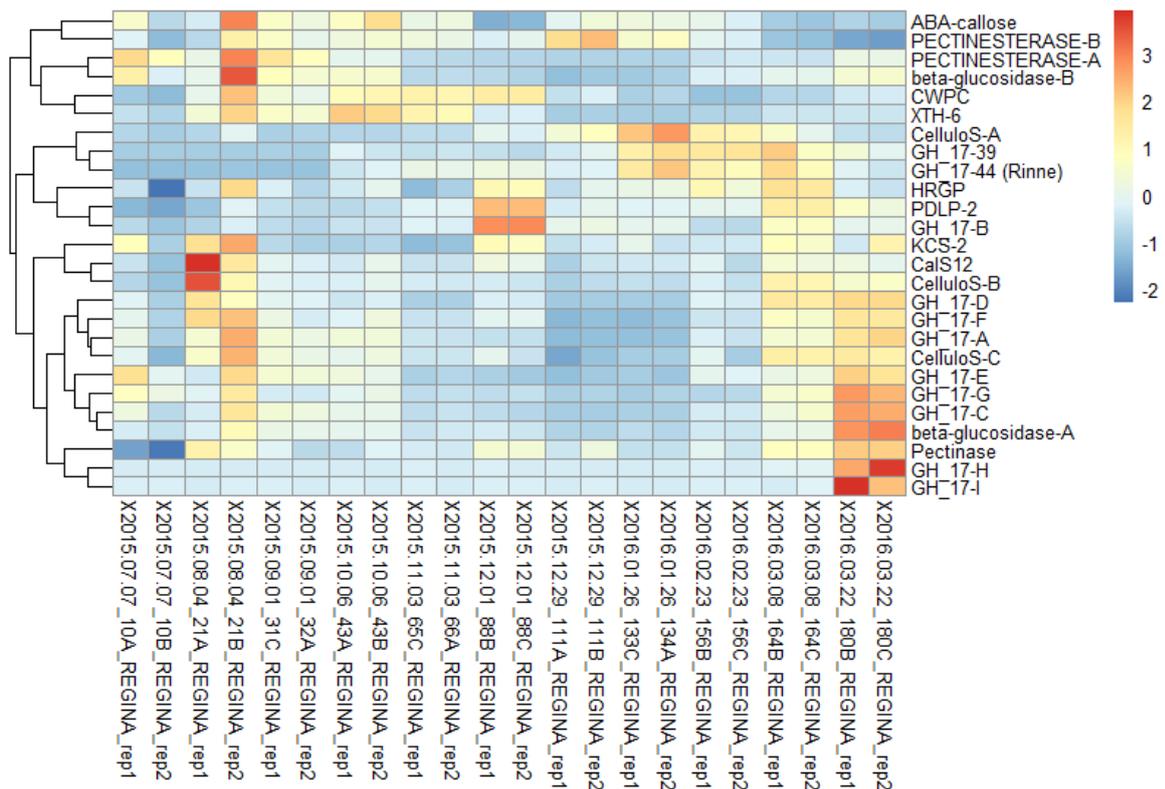
voie métabolique		Nom	gene_id	Fontion prédite pour <i>Prunus persica</i>	Fontion prédite pour l'homologue chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	
Callose	synthèse	CalS12	Prupe.3G138400	1,3-beta-glucan synthase	glucan synthase-like 5	
	dégradation	GH_17-39	Prupe.4G255600	Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase	Glycosyl hydrolase superfamily protein	
		GH_17-44 (Rinne)	Prupe.7G051800	Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase	beta-1,3-glucanase 3	
		GH_17-A	Prupe.4G019100	Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase	beta-1,3-glucanase 3	
		GH_17-B	Prupe.7G002200	Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase	beta-1,3-glucanase 3	
		GH_17-C	Prupe.3G016900	Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase	O-Glycosyl hydrolases family 17 protein	
		GH_17-D	Prupe.8G194400	Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase	O-Glycosyl hydrolases family 17 protein	
		GH_17-E	Prupe.7G217800	Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase	O-Glycosyl hydrolases family 17 protei	
		GH_17-F	Prupe.8G098000	Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase	O-Glycosyl hydrolases family 17 protein	
		GH_17-G	Prupe.4G222100	Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase	O-Glycosyl hydrolases family 17 protei	
		GH_17-H	Prupe.1G252400	Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase	O-Glycosyl hydrolases family 17 protein	
		GH_17-I	Prupe.2G245200	Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase	Glycosyl hydrolase superfamily protein	
ABA-callose	Prupe.1G375100	Catalysis of the hydrolysis of ester linkages within nucleic acids. (Bifunctional nuclease)	bifunctional nuclease in basal defense response 1			
Paroi	cellulose	synthèse	CelluloS-A	Prupe.6G025000	Cellulose synthase (UDP-forming)	cellulose synthase like E1
			CelluloS-B	Prupe.6G161300	Cellulose synthase (GDP-forming)	cellulose synthase 6
			CelluloS-C	Prupe.6G179000	CELLULOSE SYNTHASE-INTERACTIVE PROTEIN 1	binding
	dégradation	beta-glucosidase-A	Prupe.5G230400	Beta-glucosidase	B-S glucosidase 44	
		beta-glucosidase-B	Prupe.6G061000	Glucan 1,3-beta-glucosidase	Glycosyl hydrolase family protein	
	pectine	synthèse	PECTINESTERASE-A	Prupe.1G330900	Pectinesterase	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein
			PECTINESTERASE-B	Prupe.3G263600	Pectinesterase	pectin methylesterase 31
		dégradation	Pectinase	Prupe.5G117600	Pectate lyase superfamily protein	Pectin lyase-like superfamily protein
	HRGP	synthèse	HRGP	Prupe.3G310800	NA	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein
	Cire et subérine	synthèse	KCS-2	Prupe.1G025600	Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA synthase	3-ketoacyl-CoA synthase 2
	XTH		XTH-6	Prupe.6G213600	Xyloglucan:xyloglucosyl transferase	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 6
	CWPC		CWPC	Prupe.3G184000	LIPID-TRANSFER PROTEIN	cell wall-plasma membrane linker protein (CWPC)
	PDLP		PDLP-2	Prupe.1G048300	Salt stress response	plasmodesmata-located protein 2

Annexe 6

HEATmap pour la variété 'Burlat' (profil d'expression pour l'ensemble des gènes candidats au cours du temps, représentation par un code couleur)



HEATmap pour la variété 'Regina' (profil d'expression pour l'ensemble des gènes candidats au cours du temps, représentation par un code couleur)



Annexe 7

Script utilisé pour la représentation graphique des TPM au cours du temps pour tous les gènes candidats.

```
####Changer le dossier de travail dans lequel se trouve votre fichier de données
setwd("C:/Users/stagiaires3/Desktop/Stage de M2 Bonnet Diane/Génétique/Corrélation Rna-seq")

library(ggplot2)

####On récupère les fichier de données TPM et les noms des variétés disponibles
samples <- list.files(pattern="_TPM_for_graphs.csv")
Var <- lapply(strsplit(list.files(pattern = "_TPM_for_graphs.csv"),
                        split = "_", fixed = TRUE),function(x) x[1])
Var <- unlist(Var)
TPM <- vector(mode = "list", length = length(Var))
names(TPM) <- Var

for (current.var in Var) {
  TPM[[current.var]] <- read.csv2(paste(current.var, "_TPM_for_graphs.csv", sep = ""))
}

####On charge le fichier avec les noms et les accessions Prupe des gènes (voir fichier type)
genes <- read.csv2("gene-candidat-totalité.csv")
list_of_genes <- unique(genes$gene_id)
data <- TPMSREGINA
list_of_genes <- factor(list_of_genes, levels=levels(data$gene_id))

####Les graphiques seront sauvés sur un pdf (une page par graphique)
####Changer ici le nom du pdf, si le nom n'est pas changé, à chaque analyse le même fichier est écrasé et remplacé

pdf("graphs.pdf", height=5.83, width=8.27)

all_genes_data <- NULL
all_mean_data <- NULL

for (current.gene in list_of_genes){
  for (current.var in Var){
    gene_data <- TPM[[current.var]]
    gene_data$Date <- as.Date( gene_data$Date, format="%d/%m/%Y")
    gene_data <- gene_data[gene_data$gene_id==current.gene,]
    mean_data <- aggregate(gene_data$TPM, by=list(gene_data$Date, gene_data$gene_id, gene_data$Var), FUN=mean)
    colnames(mean_data) <- c("Date", "gene_id", "Var", "mean_TPM")
    gene_name <- genes[genes$gene_id==as.character(current.gene),]
    gene_name <- gene_name[1]

    gene_data$Nom <- gene_name$Nom[1]
    mean_data$Nom <- gene_name$Nom[1]
    all_genes_data <- rbind(all_genes_data, gene_data)
    all_mean_data <- rbind(all_mean_data, mean_data)
  }

  p <- ggplot(all_genes_data[all_genes_data$gene_id==current.gene,], aes(x=Date, y =TPM))
  p <- p + geom_point(aes(color=Var),size=3)
  p <- p + geom_line(data=all_mean_data[all_mean_data$gene_id==current.gene,], aes(x=Date, y = mean_TPM, color=Var), size=1)
  p <- p + theme(text = element_text(size = 16))
  p <- p + labs(title=paste(gene_name$Nom[1], current.gene, sep=" - "))

  plot(p)
}

for (current.var in Var){
  p <- ggplot(all_genes_data[all_genes_data$Var==current.var,], aes(x=Date, y =TPM))
  p <- p + geom_point(size=3, aes(color=Nom))
  p <- p + geom_line(data=all_mean_data[all_mean_data$Var==current.var,], aes(x=Date, y = mean_TPM, color=Nom), size=1)
  p <- p + theme(text = element_text(size = 16))
  p <- p + labs(title=current.var)
}

dev.off()
```

Annexe 8

Script utilisé pour la réalisation des HEATmap pour tous les gènes candidats.

```
setwd("C:/Users/stagiaires3/Desktop/Stage de M2 Bonnet Diane/Génétique/Corrélation Rna-seq")

cts <- read.csv2("Burlat_rawdata.csv")
cts$gene_id <- substr(cts$gene_id,1,14)
cts <- cts[,-1:-3]

callose <- read.csv2("gene-candidat-totalité.csv")
callose <- merge(cts, callose, by="gene_id")
cts <- callose
rownames(cts) <- cts$Nom
cts <- cts[,c(-1,-length(cts))]

samples <- as.data.frame(colnames(cts))

colnames(samples)<- "samples"

samples$Var <- NULL
samples$Date <- NULL
samples$Rep <- NULL
samples$nb <- NULL

for (ii in 1:length(samples$samples)){
  current.sample <- as.character(samples$samples[ii])
  sample.name <- strsplit(current.sample, split="_", fixed=TRUE)
  sample.name <- unlist(sample.name)
  samples$Var[ii] <- sample.name[3]
  samples$Date[ii] <- substr(sample.name[1],2,11)
  samples$Rep[ii] <- sample.name[4]
  samples$nb[ii] <- sample.name[2]
}

samples$Date <- as.Date(samples$Date, format="%Y.%m.%d")
samples$JDay <- as.numeric(samples$Date - as.Date("2015-01-01"))

rownames(samples) <- samples$samples
samples$JDay <- as.factor(samples$JDay)
samples$conditions <- paste(samples$Var, samples$JDay, sep="_")
Conditions <- samples$conditions

####z-score
cts$mean <- apply(cts, 1, mean)
cts$sd <- apply(cts, 1, sd)

z_score <- NULL
####4. then calculate Z scores
for (ii in 1:length(cts[,1])){
  current.mean <- cts$mean[ii]
  current.sd <- cts$sd[ii]
  temp <- (cts[ii,1:(ncol(cts)-2)]-current.mean)/current.sd
  z_score <- rbind(z_score, temp)
}

###Heatmap et clustering sur les z-scores
library("pheatmap")
library("RColorBrewer")

####Sort la heatmap sur z-score
cluster <- pheatmap(as.matrix(z_score), cluster_col=FALSE)

### Clustering
groups <- pheatmap(as.matrix(z_score), cluster_col=FALSE)
####Identifie les groupes
groups <-groups$kmmeans
groups <- groups$cluster
groups <- as.data.frame(groups)
groups$Nom <- rownames(groups)
```

Study of the dynamics of callose deposits in *Prunus avium* buds during dormancy.

Diane Bonnet (student in B2IPME)

Keywords: floral bud – dormancy – cherry – callose – microscopy

Because of its cold weather and reduced photoperiod, winter has a major impact on the life cycle of living organisms in the temperate areas. Perennial plants in temperate zones adopted strategies to avoid and resist several stresses during this season. However global warming has a dramatic effect on dormancy, a key step of temperate perennial plant life cycle. In this report, we study the agronomic cherry tree as it is necessary to have a better comprehension of dormancy mechanism and identify selection locks to find a new variety. During dormancy the plants have slowed physiological processes and close their connections between the cells, especially in the phloem tissue. The molecule that plays a role in opening and closing connections is callose. The aim here is to study the role of callose and its dynamics during the cherry tree dormancy. Four approaches in microscopy and a gene expression analysis on floral bud managed to show several processes. In epifluorescence, we show some dynamics of callose at floral draft with greater deposits in dormancy than in emergence. Observing the ultra-structure, it is an important parietal system and a diameter of plasmodesmes smaller in dormancy while the opposite on no-dormancy. The observation of the expression of parietal callose synthesis and degradation strengthens the microscopy results. These first results can be resumed and give new hints for varietal selection.

Etude des dépôts de callose dans les bourgeons de cerisier au cours de la dormance

Diane Bonnet (étudiante B2IPME)

Mots clefs: bourgeon floral – dormance – cerisier – callose – microscopie

Dans les régions tempérées, la transition entre croissance active et la phase de dormance est une étape nécessaire pour la survie hivernale des plantes ligneuses. Cette transition est contrôlée par les facteurs environnementaux, principalement la température. Les dates de floraison et en grande partie l'évolution de la dormance en dépendent et se sont révélées fortement affectées par le changement climatique. Dans ce contexte, l'un des défis sera de mieux comprendre les impacts possibles du changement climatique sur la dormance et la floraison afin d'engendrer par la suite des arbres fruitiers adaptés au climat futur. Des études antérieures menées sur des arbres forestiers modèles ont révélé que des dépôts de callose, en particulier dans le tissu du phloème, ont joué un rôle important dans l'entrée et la levée de dormance, en contrôlant les échanges entre les cellules et les organes. Dans cette étude, nous cherchons à étudier la dynamique de callose pendant la dormance chez les bourgeons de cerises douces. Nous avons combiné phénotypage, marquage par fluorescence, observations en microscopie électronique à transmission et approches moléculaires pour acquérir des connaissances sur les processus impliqués. Nous montrons que les bourgeons dormants sont caractérisés par un dépôt de callose dans les tissus vasculaires et que les cellules présentent une paroi plus épaisse et des plasmodesmes plus étroits. Après la levée de dormance, la capacité de transport est rétablie et les ressources sont réallouées. Ces premiers résultats peuvent donner de nouvelles pistes pour la stratégie de sélection vers des cultivars de cerises douces adaptées aux conditions climatiques futures.