



# **MASTER II Biologie et Environnement SPECIALITÉ : Plant integrative Biology and Breeding**

*RAPPORT DE STAGE PRESENTE PAR :*

**BAMIGBOLA Fassassi**

*SUJET :*

**Etude des processus impliqués dans la dormance hivernale du pommier par  
l'étude des gènes candidats**

*Responsable du Stage :*

- **Fernando Andres LALAGUNA**
- **Isabelle FARRERA**





## **REMERCIEMENTS**

En premier lieu, je tiens à remercier Evelyne Costes de m'avoir accueilli au sein de l'équipe AFEF. Je remercie bien évidemment mes maîtres de stage Fernando Andrès-Lalaguna et Isabelle Farrera. Les mots me manqueront pour vous exprimer toute ma reconnaissance. MERCI.

Je remercie également tout le personnel de la plateforme PHIV, pour leur accueil, leur gentillesse et leur disponibilité pour m'aider dans mes manipulations.

Je tiens également à remercier toute l'équipe AFEF pour m'avoir si bien accueilli et m'avoir permis de passer de bon moment de travail. Mes remerciements vont tout particulièrement à l'endroit de Christine Sanier, Vitor Falavigna et Joan Estevan.



## Résumé

Dans les régions tempérées, la transition entre la croissance active et la dormance est une étape nécessaire à la survie hivernale des plantes ligneuses. Cette transition est contrôlée par des facteurs environnementaux, tels que la température. Les pommiers doivent être exposés à de basses températures pendant l'automne et l'hiver, afin de lever la dormance et de commencer un nouveau cycle de croissance au printemps. Si les exigences de refroidissement ne sont pas satisfaites, des retards et des irrégularités dans le débourrement et la floraison se produisent, affectant la production de fruits. Dans ce contexte, la date de floraison et la dormance sont fortement affectées. Des études antérieures sur des arbres modèles ont révélé des rôles importants pour les facteurs de transcription MADS-box de type DAM, les gènes *GHI7* et les gènes *FT* dans la régulation de la dormance. Le dépôt de callose dans les plasmodesmes pendant la dormance semble également avoir des rôles importants dans l'entrée et la levée de la dormance en contrôlant l'échange entre les cellules et les organes. Dans cette étude, j'ai caractérisé les processus moléculaires et génétiques impliqués dans la dormance hivernale des bourgeons de pomme de trois variétés, Pink Lady, Golden Delicious et Reinette. Pour comprendre les processus impliqués dans le contrôle du cycle de dormance des bourgeons, j'ai effectué une analyse RT-qPCR des profils d'expression des gènes candidats *MdDAM1*, *MdDAM2*, *MdDAM4*, *MdFT1*, *MdFT2*, *MdGH17a*, *MdGH17b*, *MdGH17c*. De plus, j'ai analysé leur localisation par hybridation d'ARN in situ par marquage fluorescent. Je montre que l'expression de *GHI7* est régulée par le froid et pourrait être nécessaire pour l'hydrolyse des dépôts de callose au niveau des plasmodesmes. De plus, les gènes *DAM* et *MdFT2* pourraient être respectivement importants pour le maintien de la dormance hivernale et la promotion du nouveau cycle de croissance au printemps.

Mots clefs : bourgeon du pommier – dormance – callose – expression des gènes

## Abstract

In temperate regions, the transition between active growth and the dormancy is a necessary step for winter survival of woody plants. This transition is controlled by environmental factors, such as temperature. Apple trees need to be exposed to low temperatures during fall and winter, in order to overcome dormancy and to start a new growth cycle in the spring. If the chilling requirement is not met, delays and irregularities in budburst and flowering occur, affecting fruit production. In this context, flowering date and dormancy are strongly affected. Previous studies of model trees have revealed important roles for MADS-box DAM transcription factors, *GHI7* genes and *FT* genes in dormancy regulation. The deposition of callose in plasmodesmata during dormancy also appear to have important roles in the entrance and release of dormancy by controlling the exchange between cells and organs. In this study, I characterized the molecular and genetic processes involved in the winter dormancy of apple buds of three varieties, Pink Lady, Golden Delicious and Reinette. To understand the processes involved in controlling bud dormancy-cycle, I performed RT-qPCR analysis of the candidate gene expression profiles *MdDAM1*, *MdDAM2*, *MdDAM4*, *MdFT1*, *MdFT2*, *MdGH17a*, *MdGH17b*, *MdGH17c*. Moreover, I analyzed their localization by RNA hybridation in situ with fluorescence labeling. I show that cold-mediated expression of *GHI7* could be necessary for the hydrolysis of callose deposits at the plasmodesmata. Furthermore, *DAM* and *MdFT2* genes might be important for the maintenance of the winter dormancy and promoting the new growth cycle in the spring, respectively.

Keywords : Apple bud – dormancy – callose – gene expression



## Listes des abréviations

- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- ARN** : Acide ribonucléique
- AGL24** : *AGAMOUS-LIKE 24*
- CBF** : C-REPEAT BINDING FACTOR
- DAM** : *DORMANCY ASSOCIATED MADS-box genes*
- DEPC** : diéthyl pyrocarbonate
- Digoxigénine : Dig Oligonucleotide Tailing kit
- EVG** : *EVERGROWING*
- evg* : *mutant evergrowing*
- FLC** : *FLOWERING LOCUS C*
- FRI** : *FRIGIDA*
- FT** : *FLOWERING LOCUS T*
- GD** : *Golden Delicious*
- GH17** : *GLUCAN HYDROLASE 17*
- GIEC** : Groupe Intergouvernemental d'Experts sur l'évolution du Climat
- INRA** : Institut National de la recherche agronomique
- MADS-box** : *MCM1-AGAMOUS-DEFICIENS-SRF*
- MdDAM** : *Malus x domestica DORMANCY ASSOCIATED MADS-box genes*
- MdFLC** : *Malus x domestica FLOWERING LOCUS C*
- MdFT** : *Malus x domestica FLOWERING LOCUS T*
- MdGH17** ; *Malus x domestica GLUCAN HYDROLASE 17*
- MdMAF2** : *Malus x domestica MADS AFFECTING FLOWERING*
- MdSVP** : *Malus x domestica SHORT VEGETATIVE PHASE*
- MIKC** : MADS intervening keratin-like and C-terminal
- PBS** : Tampon phosphate
- PHIV** : Plateforme d'Histocytologie et d'Imagerie cellulaire Végétale
- PL** : *Pink Lady*
- Rn** : *Reinette*
- RT-qPCR** : Real Time-quantitative Polymerase Chain Reaction
- SOCI** : *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS*
- SVP** : *SHORT VEGETATIVE PHASE*
- svp* : *mutant short vegetative phase*
- UMR** : Unité Mixte de Recherche



## SOMMAIRES

|  |    |
|--|----|
| <b>Introduction</b> .....  | 1  |
| <b>I-Synthèse bibliographique</b> .....  | 2  |
| I-1-Le pommier ( <i>Malus x domestica</i> Bork).....                                   | 2  |
| I-1-1-Origine et importance.....   | 2  |
| I-1-2-Les différents types de bourgeon chez le pommier.....                            | 3  |
| I-2-La dormance des arbres de climats tempérés.....                                    | 3  |
| I-3-Contrôle moléculaire de la dormance des arbres de climats tempérés.....            | 4  |
| I-3-1- <i>Arabidopsis thaliana</i> comme modèle d'étude de la dormance des arbres..... | 4  |
| I-3-2-Contrôle de la vernalisation chez <i>A. thaliana</i> .....                       | 5  |
| I-3-3- Rôle des gènes <i>DAM</i> et <i>FT</i> dans la dormance.....                    | 5  |
| I-3-3-1- <i>DAM</i> dans la dormance.....  | 5  |
| I-3-3-2- <i>FT</i> dans la dormance.....   | 6  |
| I-4- Le rôle de la callose dans la dormance hivernale.....                             | 7  |
| I-5-Mon travail au cours du stage.....   | 8  |
| <b>II-Matériels et méthodes</b> .....  | 9  |
| II-1-Matériel végétal et prélèvements.....   | 9  |
| II-2-Etude des gènes candidats de la dormance hivernale du pommier.....                | 9  |
| II-2-1-Broyage et extraction des ARN.....  | 9  |
| II-2-2-Synthèse d'ADN complémentaire (ADNc).....                                       | 10 |
| II-2-3-Quantification de l'expression des gènes cibles.....                            | 10 |
| II-3-Hybridation <i>in situ</i> .....  | 10 |
| II-3-1-Méthode de fixation des bourgeons.....  | 11 |
| II-3-2-Méthode de coupe des bourgeons.....   | 12 |
| II-3-3-Phases d'hybridation <i>in situ</i> .....                                       | 12 |
| II-4-Etude du mouvement des solutés entre la tige et le bourgeon.....                  | 13 |
| II-4-1-Etude du mouvement des solutés entre la tige et le bourgeon.....                | 13 |
| II-4-2-Etude de la dynamique de dépôts de callose.....                                 | 13 |
| II-4-3-Reconstruction en 3D du bourgeon de pommier.....                                | 14 |
| II-4-4-Observation des dépôts de callose.....  | 14 |
| <b>III-Résultats</b> .....   | 14 |



|   |    |
|---|----|
| III-1-Etude des gènes candidats impliqués dans la dormance hivernale du pommier.....            | 14 |
| III-1-1-Profiles d'expression des gènes qui code $\beta$ -1,3-glucanases.....                   | 14 |
| III-1-2-Profiles d'expression des gènes <i>FT</i> .....   | 15 |
| III-1-3-Profiles d'expression des gènes <i>DAM</i> .....  | 15 |
| III-2-Hybridation <i>in situ</i> .....  | 16 |
| III-3-Etude des flux entre la tige et le bourgeon.....  | 16 |
| III-4-Etude la dynamique de déposition de callose.....  | 17 |
| <b>IV-Discussions</b> .....   | 17 |
| IV-1-Expression de <i>MdGH17a</i> , <i>MdGH17b</i> , <i>MdGH17c</i> et leur localisation.....   | 17 |
| IV-2- Expression de <i>FT1</i> , <i>FT2</i> et leur localisation.....                           | 19 |
| IV-3-Expression de facteurs de transcription <i>MdDAM1</i> , <i>MdDAM2</i> , <i>MdDM4</i> ..... | 19 |
| <b>Conclusions et perspectives</b> .....  | 21 |



## **Introduction**

Le changement climatique au niveau de notre planète est maintenant sans équivoque, comme en atteste le rapport de 2014 du Groupe Intergouvernemental d'Experts sur l'évolution du Climat (GIEC ou IPCC, 2014). Il alerte sur une accélération de l'augmentation des températures en comparaison des estimations précédentes (2 à 5°C). Or la température est un facteur important dans le développement et la croissance des plantes. C'est ainsi que sous l'effet du changement climatique, une évolution de la phénologie des plantes, marqueur clé de l'adaptation des êtres vivants aux variations climatiques est déjà observable en zone tempérée dans les deux hémisphères. Dans ce contexte, de nombreuses études ont mis en évidence des avancées au niveau des dates de feuillaison, floraison et maturité, en particulier chez les espèces pérennes fruitières (Menzel & Fabian, 1999). Les conditions climatiques futures en régions tempérées pourraient régionalement devenir proches de celles que l'on observe actuellement en zones subtropicales (Legave et al., 2015 ; Malagi et al., 2015). Une floraison avancée conduisant à des risques accrus de gels printaniers, chutes des bourgeons, asynchronie florale des variétés à pollinisation croisée, avancée de maturité, seront alors les événements biologiques qui affecteront la régularité et la qualité de la production des espèces fruitières dans les zones actuelles de culture de régions tempérées (Gleizer et al., 2007). Or la production des espèces fruitières, et en particulier celle des pommiers, est particulièrement importante en France d'un point de vue économique. Il apparaît donc essentiel de disposer de variétés présentant une floraison et une maturité adaptées aux futures conditions climatiques pour maintenir les rendements des productions fruitières corrects. Dans cet objectif, une des stratégies est de mieux caractériser les processus physiologiques et moléculaires impliqués dans la phénologie et tout particulièrement les phase de dormance hivernale dont le bon déroulement est essentiel pour atteindre une floraison et une production satisfaisante. En dépit des nombreuses études s'intéressant à la dormance au cours des dernières décennies, la compréhension actuelle de ce phénomène de sa variabilité et ses liens avec des processus physiologiques et moléculaires sous-jacentes est insuffisantes (Tang et al., 2016). Peu ont tenté d'ouvrir la 'boîte noire' du bourgeon au cours de l'hivers. A l'exception de Bubàn et Faust (1995) qui ont montré que les primordia floraux dans les bourgeons de pommier continuaient à se différencier et se développer tout au long de la période hivernale les analyses sur arbres fruitiers ont porté en majorité de bourgeons non dormants prélevés au cours de l'été, au moment de l'initiation et de la différenciation florale (Sung et al., 2000 ; Bitonti et al., 2002 ; Brunel et al., 2002 ; Andreini et al., 2008).



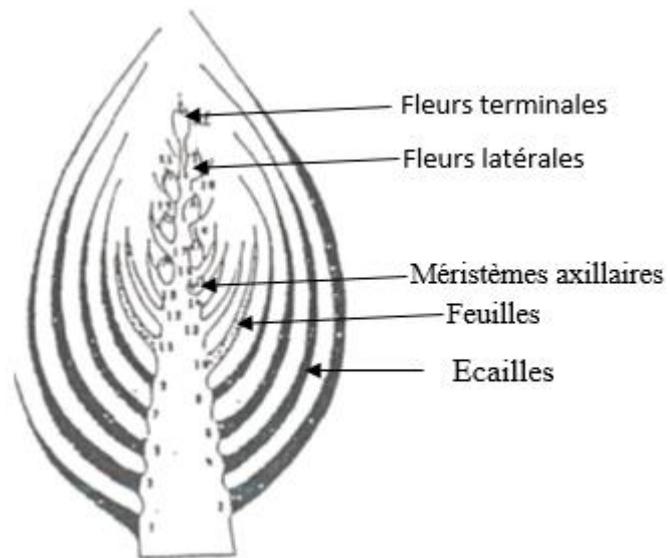
Des études génétiques et moléculaires conduites sur le peuplier suggèrent que l'entrée et la sortie de dormance des bourgeons sont gouvernées par l'arrêt de la signalisation intercellulaire induit par des dynamiques de dépôts de callose au niveau des plasmodesmes (Rinne & van der Schoot, 2003 ; Rinne et al., 2011). Chez les arbres fruitiers, les mécanismes liés à la dynamique et au contrôle des dépôts de callose au niveau du bourgeon restent largement méconnus. Dans ce cadre-là, le projet INRA « Etude histologique et moléculaire des bourgeons floraux de deux rosaceae fruitières au cours de la dormance hivernale » (Acronyme : Hidro) à été initié à l'automne 2016. Ses objectifs sont d'approfondir les connaissances sur le contrôle de la dormance, rechercher des marqueurs cellulaires et moléculaires de l'état de dormance des bourgeons chez le pommier et le cerisier. Il associe trois équipes de recherche : l'équipe Adaptation du Cerisier au Changement Climatique de l'UMR BFP de Bordeaux ; l'équipe Architecture et Fonctionnement des espèces fruitières (AFEF) et la plateforme d'histocytologie et d'imagerie cellulaire végétale (PHIV) de l'UMR AGAP, à Montpellier. S'inscrivant dans le projet Hidro et réalisé au sein de l'équipe AFEF et sur la plateforme PHIV, l'objectif principal de mon stage a été de caractériser les processus impliqués dans la phase de dormance hivernale des bourgeons de pommier de trois variétés que sont *Pink Lady*, *Golden Delicious*, *Reinette* par l'étude des gènes candidats impliqués dans la dormance, l'étude des flux à l'intérieur des bourgeons et l'étude de la dynamique des dépôts de callose par la reconstruction en 3D du bourgeon.

## **I-Synthèse bibliographique**

### **I-1-Le pommier (*Malus x domestica* Bork)**

#### **I-1-1-Origine et importance**

Dérivant de l'espèce *Malus sieversii* Lebed. *M Roem.* endémique du sud du Kazakhstan (Juniper et al, 1999), le pommier appartient à la famille des rosaceae. La famille des rosaceae est une grande famille d'importance économique qui contient les principales espèces fruitières et ornementales des régions tempérées (Dirlewanger et al., 2004) comme le cerisier (*Prunus avium*), le pêcher (*Prunus persica*), l'abricotier (*Prunus armeniaca*) mais aussi le fraisier (*Fragaria annanassa*), et le rosier (*Rosa spp*). Le pommier est une des plus importantes espèces fruitières cultivées dans le monde. Sa production mondiale s'élève à environ 89 millions de tonnes de pommes annuellement dans le monde, dont 1,8 millions en France. La pomme est l'un des fruits les plus consommés, après les agrumes, la banane et le raisin. Le pommier est une espèce adaptée au cycle saisonnier de sa région d'origine, le



**Figure 1** : Représentation schématique d'un bourgeon de pommier de génotype Golden Delicious et de ses différentes pièces

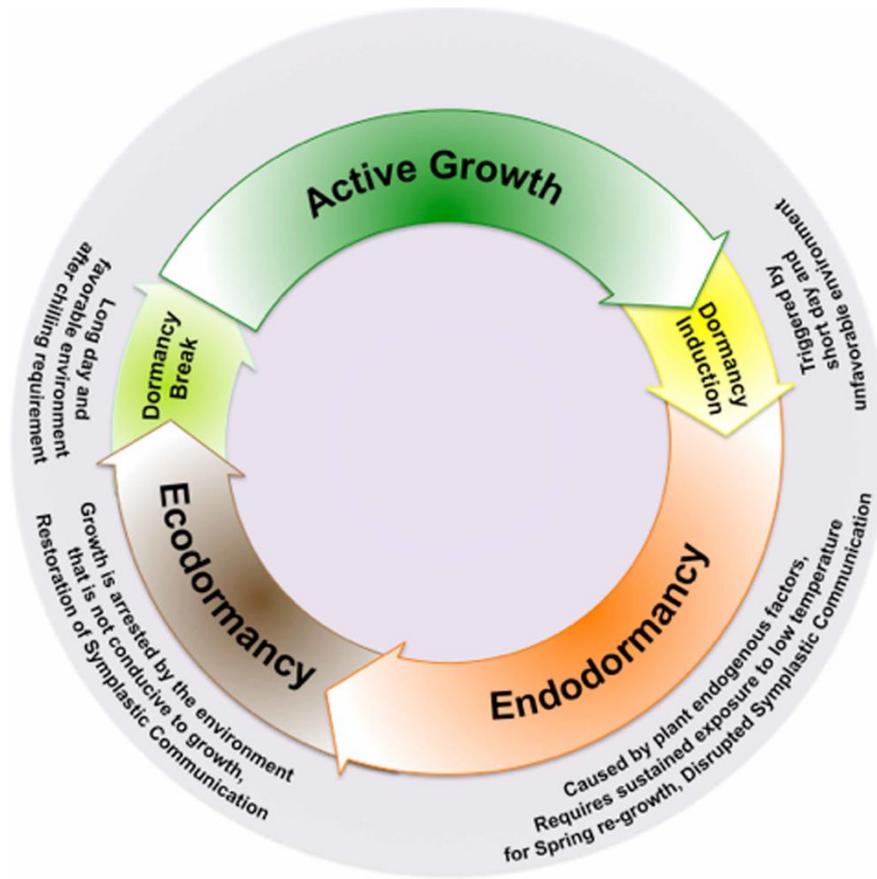
Kazhastan, qui est caractérisé par de grandes amplitudes de température entre été et hiver, une variation de la photopériode ainsi que des précipitations variables selon les saisons (Westwood, 1993). Malgré cela, le pommier est une espèce cultivée dans diverses régions climatiques. On trouve des vergers de pommiers dans des régions tempérées : Chine, Europe, Etats-Unis par exemple, mais aussi dans d'autres types de climat comme au sud du Brésil où les pommiers poussent en altitude ou en Afrique du sud. C'est un arbre hermaphrodite à feuilles caduques extrêmement répandu dans les zones tempérées. Le climat optimal pour sa croissance correspond aux zones tempérées avec une intensité lumineuse importante, accompagnée des journées chaudes et des nuits fraîches (Westwood, 1993). Comme beaucoup d'autres espèces d'arbres tempérés, l'obtention d'un rendement optimal du pommier est intimement liée au bon déroulement de la dormance ces bourgeons mixtes pendant l'hiver et nécessite l'accumulation d'un certain nombre d'heures de refroidissement.

### **I-1-2-Les différents types de bourgeon chez le pommier**

Le bourgeon est une structure constituée d'un méristème protégé par des écailles. Ces écailles sont en fait de petites feuilles modifiées couvertes d'une cuticule et sont souvent poilues. Les poils servent de zone tampon protégeant le méristème des variations climatiques (Olsen et al., 2003). Le pommier présente deux types de bourgeons : les bourgeons végétatifs et les bourgeons mixtes. Les bourgeons végétatifs renferment des ébauches foliaires et donneront naissance au printemps à une tige feuillée. Les bourgeons mixtes possèdent à leur base une partie végétative constituée de plusieurs feuilles puis une partie florale dans la zone apicale avec plusieurs fleurs axillaires et une fleur terminale (figure 1).

### **I-2-La dormance des arbres de climats tempérés**

Les arbres des climats tempérés utilisent de façon cyclique les signaux environnementaux tels que la durée du jour et la température, afin de coordonner leur croissance et leur développement en fonction des changements saisonniers du climat. C'est ainsi que pendant la période hivernale ces espèces entrent dans une phase de repos appelée dormance afin d'éviter les dommages occasionnés par les températures froides (Lang et al., 1987). La dormance des bourgeons, définie comme l'incapacité d'un méristème à reprendre sa croissance dans des conditions favorables (Rohde & Bhalerao, 2007), est particulièrement importante pour ces espèces dont les arbres fruitiers. Le bon déroulement et le moment de levée de dormance ont une incidence importante sur la productivité et la distribution spatiale de ces arbres. La dormance des arbres des climats tempérés, se déroule en trois phases régulées par la



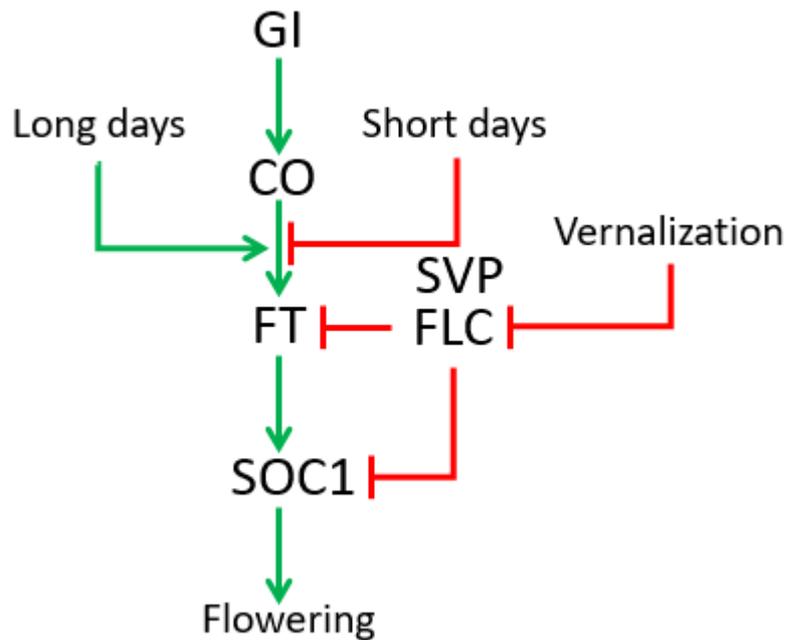
**Figure 2 :** Cycle de Transition saisonnière de la dormance hivernale des arbres tempérés. Les plantes vivaces tempérées synchronisent l'apparition de leur dormance végétative en accord avec les changements dans l'environnement. La diminution de la durée du jour est détectée par les phytochromes et cela déclenche l'arrêt de la croissance et l'entrée dormance sous influence de basse température. Une exposition prolongée à des températures froides est requise pour la levée de la dormance. La croissance reprend une fois que l'environnement devient propice (c'est-à-dire, la durée du jour et la température au-dessus des seuils critiques). Shim et al., 2014

photopériode et la température : la paradormance, l'endodormance et l'écodormance (Lang et al., 1987). La paradormance, également connue sous le nom de dormance apicale, est la suppression de la croissance des bourgeons latéraux par la partie en croissance active, telle que le méristème apical. L'endodormance représente la dormance hivernale profonde. Il s'agit d'une répression endogène, contrôlée par des facteurs physiologiques internes au bourgeon qui ne sont pas encore totalement élucidés et pendant cette phase, les méristèmes sont isolés du reste de la plante (figure 2). Pour lever l'endodormance, un cumul de froid spécifique selon les espèces et les variétés est nécessaire, jusqu'à satisfaction des besoins en froid (chilling requirement) pour passer à la phase suivante, l'écodormance (Lang et al., 1987). L'écodormance, parfois nommée quiescence, se déroule de la fin de l'hiver au début du printemps. Elle est également régulée par des facteurs environnementaux comme des températures ou une photopériode (Lang et al., 1987). Le contrôle de sa levée se fait par accumulation de chaud (forcing) jusqu'à satisfaction des besoins en chaleur (heat requirement) nécessaires pour atteindre le stade de débourrement et de floraison (Horvath et al., 2003). Les plantes pérennes doivent donc être exposées à des températures basses au cours de l'hiver pour assurer correctement leur cycle de dormance (figure 2). Ce fonctionnement cyclique de la dormance est actuellement perturbé par le réchauffement terrestre, notamment avec une sortie d'écodormance et une floraison précoce, provoquant ainsi 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 pourrait avoir des répercussions pour les producteurs de fruits (Menzel & Fabian, 1999).

### **I-3-Contrôle moléculaire de la dormance des arbres de climats tempérés**

#### **I-3-1-Arabidopsis thaliana comme modèle d'étude de la dormance des arbres**

Les plantes ont développé plusieurs mécanismes pour contrôler leur temps de floraison en réponse aux signaux environnementaux et endogènes. Les changements de température et de photopériode tout au long de l'année fournissent ainsi aux plantes des indices leur permettant de détecter les changements saisonniers (Horvath et al., 2003). De nombreuses plantes des climats tempérés doivent nécessairement subir une période de froid pour passer du stade végétatif au stade reproducteur (Youngjae Pyo et al., 2014). Chez la plante modèle *A. thaliana*, cette nécessité de froid pour fleurir est appelé vernalisation et cela a beaucoup été étudié (Sheldon et al., 1999 ; Andrés et Coupland, 2012). Bien que différente de la dormance, la



**Figure 3** : Régulation du temps de la floraison et de la vernalisation chez *Arabidopsis thaliana*. Les lignes rouges et vertes représentent respectivement la répression et l'induction de l'expression. Lors de la vernalisation, *FLOWERING LOCUS C (FLC)* régule négativement l'expression des gènes *FLOWERING LOCUS T (FT)* et de *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 (SOC1)*. De longue photopériode induit les activités de gènes *GIGANTEA (GI)* et *CONSTANS (CO)* qui vont provoquer l'induction du gène *FT*. *FT* va induire l'activité de *SOC1* qui provoquera l'induction de la floraison. Adaptée de Andrés Fernando Lalaguna non publié.

vernalisation chez *A. thaliana* permet de mieux comprendre le déterminisme génétique de la dormance des arbres des climats tempérés notamment celle des rosaceae, famille dans laquelle la réalisation des études génétiques est très complexe.

### **I-3-2-Contrôle de la vernalisation chez *A. thaliana***

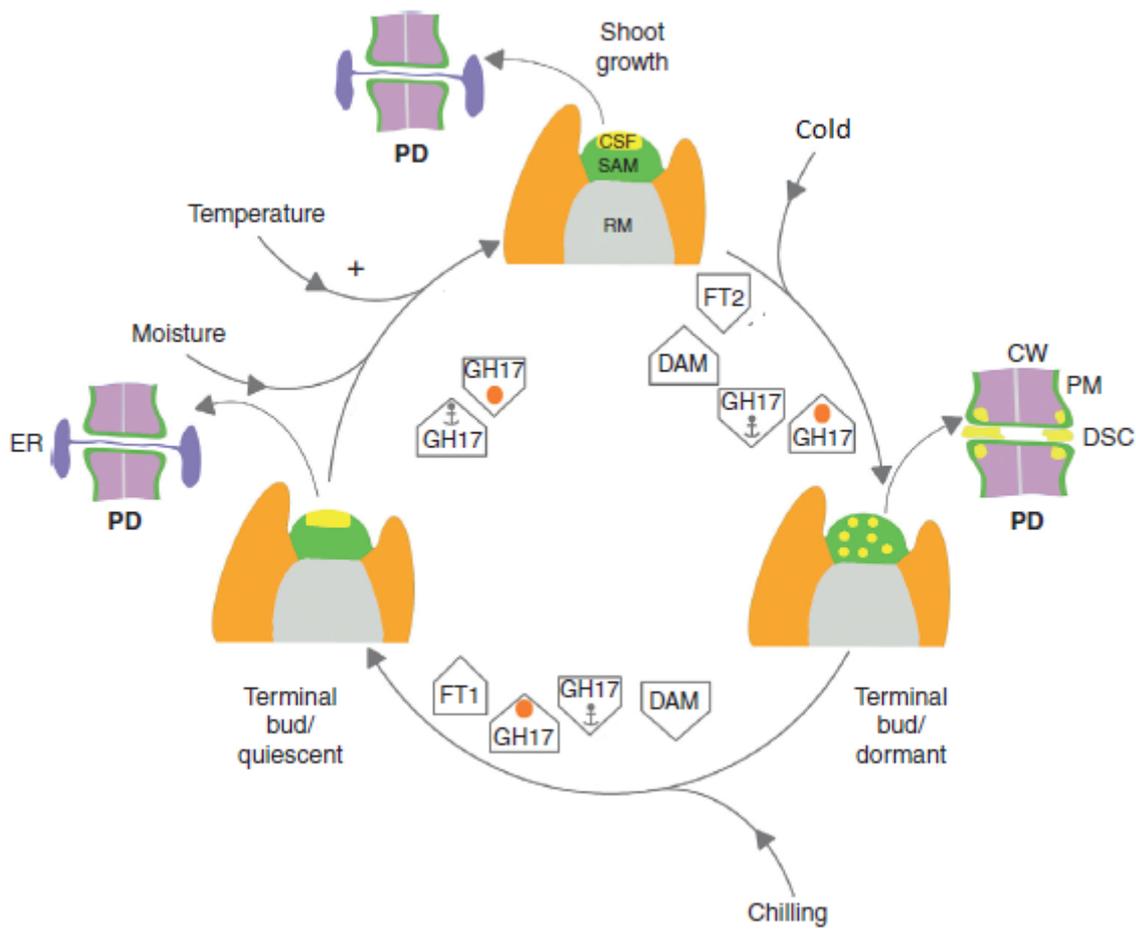
La vernalisation chez *A. thaliana* est largement sous le contrôle du gène *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. Le gène *FLC* code un facteur de transcription de la famille des *MADS-box* qui se lie au promoteur du gène de floraison (*FT* et *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 [SOC1]*), pour bloquer leur transcription (Sheldon et al., 1999 ; Michaels et al., 1999). *FT* est un promoteur floral qui intègre à la fois la photopériode et les signaux de température. Les ARNm du gène *FT* sont induits dans les feuilles par une longue photopériode un mécanisme qui implique les activités des gènes *GIGANTEA (GI)* et *CONSTANS (CO)*. La protéine qui code ce gène *FT* se déplace à travers les tissus vasculaires jusqu'à l'apex pour induire la floraison (figure 3) (Sheldon et al., 1999 ; Andrés et Coupland, 2012).

Le taux d'ARNm du gène *FLC* diminue progressivement lorsque les plantes sont exposées au froid hivernal (Michaels et al., 1999). Cela entraîne l'activation de l'expression de *FT* en réponse à l'augmentation de la longueur du jour au printemps pour favoriser la floraison (figure 3) (Andrés et Coupland, 2012). Des expériences réalisées sur un mutant nommé *short végétative phase (svp)* d'*A. thaliana* ont permis ainsi de découvrir que *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)* code pour un facteur de transcription *MADS-box*, et joue également un rôle dans l'inhibition de la floraison (Fujiwara et al., 2008 ; Andrés et Coupland, 2012). Ainsi, le complexe protéique SVP/FLC vas inhiber par liaison directe au locus *FT* la floraison (Li et al., 2008).

### **I-3-3- Rôle des gènes *DAM* et *FT* dans la dormance**

#### **I-3-3-1-DAM dans la dormance**

Depuis quelques années, différentes approches incluant la génétique et la génomique ont été utilisées pour identifier les principaux mécanismes intervenant dans le contrôle de la dormance. Chez les rosacées, le pêcher (*Prunus persica*) a fait l'objet de plusieurs recherches du fait qu'il comporte un génotype dont le mutant est nommé '*evergrowing (evg)*' (Bielenberg et al., 2004). Il apparaît que ce génotype mutant, ne parvient pas à entrer en dormance et présente une croissance persistante (Wang et al., 2002). Ce génotype mutant *evg* présente une délétion au niveau de quatre des six gènes codant les facteurs de transcription de



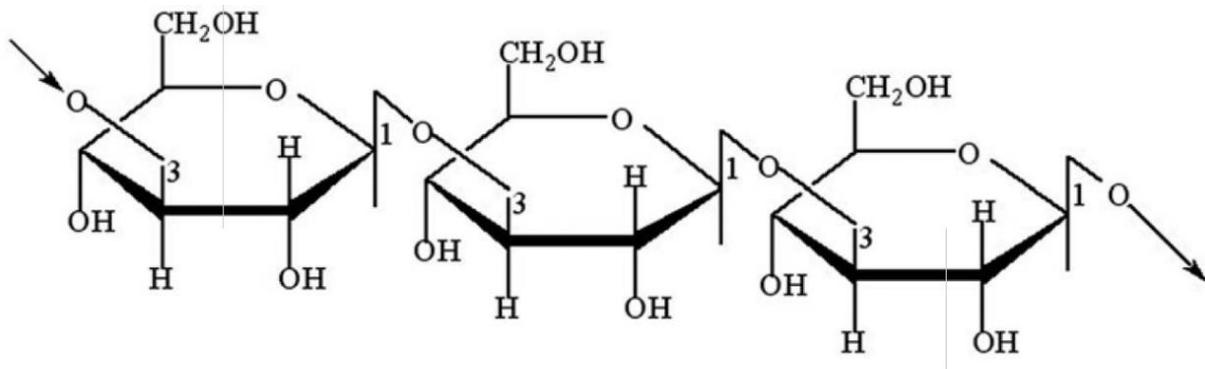
**Figure 4** : Modèle simplifié du cycle de dormance hivernale chez le peuplier. L'apex de la pousse est constitué de deux unités morphogénétiques distinctes, le méristème apical (SAM, vert) et la base du méristème (RM, gris). Le SAM passe par trois phases distinctes, une phase de croissance active (en haut), une phase de dormance (droite) et une phase de repos (gauche). Pendant la phase de croissance active, le sommet du SAM possède un champ symplasmique central (CSF, jaune) ainsi qu'un champ symplasmique périphérique (non représenté), relié par des plasmodesmes ouverts (PD, violet). Lors de l'apparition du froid, l'expression du gène *FT2* est réprimée dans les feuilles, le RM est inactivé et le SAM entre dans un état de dormance (à droite). Toutes les cellules du SAM sont isolées en raison de la fermeture de plasmodesmes avec des disjoncteurs de callose (DSC), ce qui entraîne la dissipation des voies symplasmiques (cercles jaunes). Les gènes contrôlant cette transition sont montrés à l'intérieur des flèches directionnelles. L'expression du gène *FT2* diminue, les protéines de la famille GH17 qui sont associées à la production de corps lipidiques (LB, cercles orange remplis) augmente et les protéines GH17 avec un ancrage GPI (ancres) diminue progressivement. La fonction du gène *MADS BOX (DAM)* associée à la dormance augmente également. Une exposition à un refroidissement suffisant entraîne alors une hyper induction de *FT1*, une levée de dormance et une entrée dans un état de repos avec une tolérance élevée à la congélation (à gauche). Cela implique la régulation à la hausse et à la baisse des facteurs clés en fonction de leur état précédent comme indiqué par les boîtes en forme de flèche. Après une augmentation appropriée de l'humidité et de la température, la croissance du méristème reprend, associée à une régulation à la hausse ou à la baisse des composants régulateurs requis. Paroi cellulaire (CW) ; membrane plasmique (PM) ; réticulum endoplasmique (RE). Adaptée de Paul et al., 2014.

type MADS-box nommé *Dormancy Associated MADS-box (DAM)* (Bielenberg et al., 2008 ; Leida et al., 2012). Les gènes *DAM* du pêcher appartiennent au clade *SVP/StMADS11* représenté chez *A. thaliana* par *SVP* et *AGAMOUS-like 24 (AGL24)* (Leseberg et al., 2006). Chez *A. thaliana*, les deux gènes (*SVP* et *AGL24*) agissent de manière antagoniste sur la régulation du temps de floraison (Porto et al., 2016). Parmi ces six gènes *DAM*, *DAM1*, *DAM2* et *DAM4* ont des profils d'expression plus étroitement associés à l'arrêt de la croissance et à l'apparition de bourgeons (Bielenberg et al., 2008 ; Li et al., 2009) et *DAM3*, *DAM5* et *DAM6* sont exprimées en hiver, atteignant un minimum juste avant le débourrement du pêcher (*Prunus persica*) (Bielenberg et al., 2008 ; Jimenez et al., 2010). Cela suggère un rôle des gènes *DAM* dans le processus de contrôle de la dormance (figure 4). Aussi, des homologues de ces gènes *DAM* sont également retrouvés chez d'autres espèces telles que le poirier (Ubi et al., 2010), l'abricotier (Sasaki et al., 2011) ainsi que dans les cactus (Horvath et al., 2010).

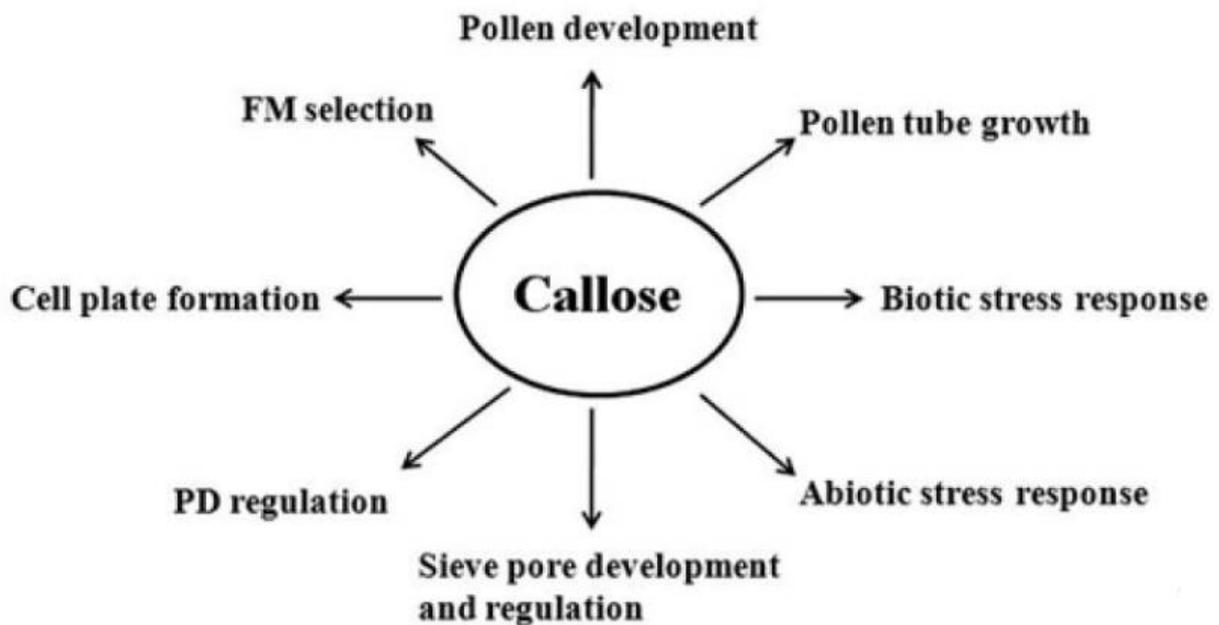
Le séquençage du génome du pommier a révélé un nombre relativement élevé de gènes MADS-box, probablement en raison d'une duplication récente de son génome (Porto et al., 2016). Il a été identifié et caractérisé chez cette plante, quatre gènes *DAM*. Il s'agit des gènes *MdDAM1*, *MdDAM2*, *MdDAM3* et *MdDAM4* (Porto et al., 2016). Ces gènes présentent des profils d'expressions similaires à ceux rapportés pour les gènes *DAM* du pêcher, du poirier, et d'abricotier (Bielenberg et al., 2008 ; Porto et al., 2016). Les quatre gènes *MdDAM* partagent aussi des séquences hautement conservées dans leur intron avec tous les gènes *DAM* des rosaceae (Porto et al., 2016). Un travail plus récent a aussi démontré la présence d'un autre gène *DAM* (*MdDAMb*) et deux gènes *SVP* (*SVPa* et *SVPb*) chez le pommier de variété Gala (Wu et al., 2017).

### **I-3-3-2-FT dans la dormance**

Le génome de *Populus trichocarpa* contient entre autres des gènes codant pour des protéines appartenant à la famille CENTRORADIALIS (CEN) dans laquelle se trouve les promoteurs de la floraison *FLOWERING LOCUS T (FT)* (figure 3). Ainsi, deux homologues ont été retrouvés chez le peuplier et il s'agit de *FT1* et de *FT2*. *FT1* est induit par le froid et est un promoteur précoce de la floraison. Alors que *FT2* est induit par des températures chaudes et déclenche la croissance végétative (Hsu et al., 2011). Deux homologues du gène (*FT*) ; *MdFT1* et *MdFT2*, ont été isolés chez le pommier également. Les deux gènes s'expriment principalement dans les tissus floraux et à différents stades du développement de la fleur. Aussi,



**Figure 5 :** Représentation d'un fragment de  $\beta$ -1,3-glucane montrant les liaisons entre les résidus de sucre. (Chen and Kim 2009)



**Figure 6 :** Rôle de la callose dans de multiples aspects du développement des plantes et dans leurs réponses au stress abiotique et biotique. Plasmodesme (PD) et Mégaspore fonctionnel (FM). (Chen and Kim 2009)

la surexpression des homologues du gène *FT* du pommier entraîne la levée de dormance et une floraison précoce (Tränkner et al., 2010 ; Kotoda et al., 2010).

#### **I-4- Le rôle de la callose dans la dormance hivernale**

Des études génétiques et moléculaires conduites sur le peuplier suggèrent que l'entrée et la sortie de dormance des bourgeons sont gouvernées par l'arrêt de la signalisation intercellulaire induit par des dynamiques de dépôts de callose au niveau des plasmodesmes (Rinne & van der Schoot, 2003 ; Rinne et al, 2011). La callose est un glucane constitué de résidus de glucose unis par des liaisons osidiques  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) avec des ramifications  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6). Très présente chez les plantes supérieures notamment au niveau des parois, la molécule est compacte et présente une structure hélicoïdale (figure 5). Chez les végétaux, elle est impliquée dans les processus de développement et aussi dans les réponses aux stress abiotiques et biotiques (figure 6). Les dépôts de callose sont contrôlés par des enzymes de synthèse et de dégradation appartenant à des familles multigéniques : les callose-synthases et les  $\beta$ -1,3-glucanases, de la famille des GLUCANES HYDROLASES 17 (GH17). Les gènes *GH17* 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 (Rinne et al., 2011). Pendant la dormance, les observations suggèrent que la callose se dépose à l'entrée des plasmodesmes et est impliquée dans la limitation des échanges symplastiques (Rinne et al., 2001 ; Chen et Kim 2009). Chez le peuplier, on assiste ainsi au rétrécissement du plasmodesme qui va limiter la capacité du méristème apical à fonctionner comme un puits et sa capacité à contribuer à l'émergence des pousses apicales pendant la période de dormance. Les dépôts de callose apparus lors de cette dormance du méristème apical, sont présents autour et à l'intérieur du plasmodesme et cela obstrue le transport symplasmique et la signalisation cellulaire (Rinne et al., 2011). Toutes les cellules du méristème apical sont ainsi isolées en raison de la fermeture des plasmodesmes (figure 4). Le profil d'expression de *GH17* observé durant le processus de dormance du peuplier suggère un rôle de ce gène dans le contrôle de la dynamique de dépôt de callose au cours du processus (Rinne et al., 2011). Par conséquent, *GH17* semble participer à la fermeture et à la réouverture des plasmodesmes. Toutes les implications des dépôts de callose et son rôle prépondérant dans la régulation de la dormance hivernale des rosacées fruitières notamment le pommier sont inexistantes à notre connaissance.



## **I-5-Mon travail au cours du stage**

Mon stage porte sur le contrôle moléculaire de la dormance des bourgeons du pommier. Ce travail s'inscrit dans un projet INRA appelé Hidro articulé entre les équipes Adaptation du Cerisier au Changement Climatique de l'UMR BFP de Bordeaux ; l'équipe Architecture et Fonctionnement des espèces fruitières (AFEF) et la plateforme d'histocytologie et d'imagerie cellulaire végétale (PHIV) de l'UMR AGAP, à Montpellier.).

Pendant l'endodormance, les bourgeons sont isolés du reste de la plante par des dépôts de callose au niveau des plasmodesmes. Il faudra alors un refroidissement suffisant accumulé pendant l'hiver pour provoquer la levée de l'endodormance, la croissance des bourgeons et la floraison au printemps. La réactivation de la croissance dépend donc probablement de la réouverture des communications symplastiques dans les bourgeons, permettant le flux de l'eau dans les cellules méristématiques. On pense que des gènes apparentés à l'homéostasie de la callose (c'est-à-dire les gènes *GHI7*), les facteurs de transcription (c'est-à-dire les gènes *DAM*) et la régulation du temps de floraison (gènes *FT*) contrôlent génétiquement ce processus. Cependant, le moment précis de l'apparition des événements physiologiques et moléculaires décrits ci-dessus qui caractérisent le processus de dormance n'est toujours pas clair.

Dans ce contexte, mon objectif principal est de caractériser le schéma temporel et spatial de l'expression des gènes impliqués dans le cycle de dormance des bourgeons du pommier. Pour cela, j'ai étudié le profil d'expression temporelle des gènes *GHI7*, *DAM* et *FT* dans les bourgeons de trois génotypes de pommier avec des périodes de débourrement différentes. J'ai donc recueilli à intervalles réguliers des bourgeons de ces arbres d'octobre à février, couvrant toute la période de la dormance hivernale. Ensuite, j'ai analysé le profil d'expression des gènes sélectionnés par RT-qPCR. Un autre groupe de bourgeons a été récolté pour des expériences d'hybridation *in situ* afin d'étudier le profil spatial de l'expression de gènes intéressés. Avec ces expériences, je pourrais décrire le moment des événements moléculaires importants qui se produisent pendant la dormance. En parallèle, j'ai étudié l'équilibre des flux d'eau au sein des bourgeons dormants afin de comprendre la dynamique du dépôt de callose au cours du cycle de dormance. J'ai également initié une caractérisation détaillée de la dynamique de la callose dans ces bourgeons dormants en utilisant des techniques liées à la microscopie, y compris l'imagerie 3D des bourgeons. C'est l'ensemble de ces expériences, avec d'autres dosages physiologiques, me permettraient de mieux définir le moment de la levée de dormance de la repousse des bourgeons de pommier.

En conclusion, les résultats obtenus par ces approches me permettent de proposer un rôle des



gènes clés dans la régulation de la dormance des bourgeons du pommier. De plus, j'ai observé des différences importantes dans le comportement de l'expression de ces gènes entre les différents génotypes de pommier. Tout cela renforce l'idée du fort contrôle génétique du processus de la dormance du pommier.

## **II-Matériels et méthodes**

### **II-1-Matériel végétal et prélèvements**

Le matériel végétal utilisé dans le cadre de cette étude a été prélevé dans un verger expérimental de la station de recherche appliquée Fruits et Légume - SudExpé de Marsillargues (04°09'E; 43°37'N, 2 m d'altitude). Trois variétés de pommiers ont été retenues : la variété Golden Delicious (GD) considérée comme variété de référence chez le pommier, une variété à floraison précoce Pink Lady (PL), et Reinette (Rn) dont la floraison est généralement tardive. Ces prélèvements ont été réalisés au cours de l'automne et de l'hiver 2017-2018, à des dates précises (Annexes – tableau 3), de manière à couvrir les phases d'endodormance et d'écodormance qui classiquement se réalisent d'octobre à février-mars. Afin d'avoir suffisamment de matériel pour toutes les activités prévues dans le cadre de mon travail, 891 bourgeons floraux et 405 tiges présentant des rameaux courts porteurs de bourgeons floraux ont été prélevés tous génotypes confondus. Les détails sur le nombre de prélèvements par variétés, par dates et par objectifs spécifiques sont rassemblés dans le tableau 3 (cf Annexes). Le conditionnement du matériel a été réalisé immédiatement en verger en fonction des analyses programmées. Cet aspect sera précisé pour chaque type d'analyse dans les paragraphes qui suivent.

### **II-2-Etude des gènes candidats de la dormance hivernale du pommier**

Trois bourgeons floraux (Annexes - tableau 3) par génotype et par date ont été prélevés et poolés. Les nombreuses écailles brunes ont été immédiatement enlevées au verger à l'aide d'une pince. Puis les bourgeons ont été détachés de la tige à l'aide d'un scalpel et placés dans des tubes de 2 ml immédiatement plongés dans l'azote liquide (-195,79°C). Au retour au laboratoire, ils ont été conservés au congélateur à -80°C.

#### **II-2-1-Broyage et extraction des ARN**

Lors du broyage, les échantillons sont immergés dans l'azote liquide. Pour améliorer la qualité du broyage automatique, réalisé durant mon stage avec un broyeur de type Genogrinder, SPEX® SamplePrep) une bille a été ajoutée dans chaque tube contenant les échantillons. Le broyage automatique au Genogrinder (Genogrinder, SPEX® SamplePrep) permet de broyer

**Tableau 1** : Gènes de dormances cibles et leurs amorces

| Species | Gènes cibles | Oligo Name   | Accession code | Sequence                |
|---------|--------------|--------------|----------------|-------------------------|
| Apple   | MdoDAM1      | MdoDAM1 Fw   | MD15G1384500   | GGAGAAGGGGGATTTTCAAGA   |
| Apple   |              | MdoDAM1 Rv   | MD15G1384500   | CGTGATGAATCGTGGGTTGA    |
| Apple   | MdoDAM2      | MdoDAM2 Fw   | MD08G1196900   | TGAAGAGCTGTCGATTCTGTGTG |
| Apple   |              | MdoDAM2 Rv   | MD08G1196900   | CGATTTTTCCCCAGTATGTGA   |
| Apple   | MdoDAM4      | MdoDAM4 Fw   | MD08G1197300   | ATATGAAGGGTGAGGACCT     |
| Apple   |              | MdoDAM4 Rv   | MD08G1197300   | CGTAAGTGCCATAATCTCAC    |
| Apple   | MdoMDH       | MdoMDH Fw    | MD16G1219000   | CGTGATTGGGTACTTGGAAC    |
| Apple   |              | MdoMDH Rv    | MD16G1219000   | TGGCAAGTGACTGGGAATGA    |
| Apple   | MdoWD40      | MdoWD40 Fw   | MD08G1215900   | GGATTTACTGTGTTGGTGAAG   |
| Apple   |              | MdoWD40 Rv   | MD08G1215900   | TGCCAATTACCTCCTTTTCGTG  |
| Apple   | MDP147201    | MDP147201 Fw | MD00G1075400   | AGTTCCGGTCGACATTTACG    |
| Apple   |              | MDP147201 Rv | MD00G1075400   | TTGACGATGGACATGGCATA    |
| Apple   | MDP327191    | MDP327191 Fw | MD14G1079900   | ATTCAAGAGCAAGGGGGAAC    |
| Apple   |              | MDP327191 Rv | MD14G1079900   | ACTTCTGCTTGGGGTGGTAA    |
| Apple   | MDP265527    | MDP265527 Fw | MD03G1171500   | GCCCTGAACCAGTTGAGAAA    |
| Apple   |              | MDP265527 Rv | MD03G1171500   | GTGAGAGAACATGGGCACAA    |
| Apple   | MdoFT1       | MdoFT1 Fw    | MD12G1262000   | CTAGAGCTGATATTGGTGGGA   |
| Apple   |              | MdoFT1_Rv    | MD12G1262000   | CCAATTGGCGAAAACACCACC   |
| Apple   | MdoFT2       | MdoFT2 Fw    | AB458504.1     | CCAAGTGACCCCAACCTAAA    |
| Apple   |              | MdoFT2_Rv    | AB458504.1     | GCGAAACAGCACAAAAACAA    |

jusqu'à 24 échantillons et d'obtenir des poudres fines qui facilite l'extraction des ARN totaux des bourgeons floraux. L'extraction des ARN totaux des bourgeons floraux est réalisée en utilisant le kit commercial Spectrum Plant Total RNA de la marque Sigma et en suivant les instructions du fabricant (Annexes-protocole d'extraction des ARNs). L'ARN final, également appelé ARN totaux, est repris dans 37 µl d'une solution d'élution et quantifié avec un NanoQuant (Infinite® 200 NanoQuant Tecan). La vérification de sa qualité est réalisée avec un instrument TapeStation 4200 (technologies Agilent).

### **II-2-2-Synthèse d'ADN complémentaire (ADNc)**

La concentration des ARN totaux de chaque échantillon est normalisée afin d'avoir la même concentration pour tous les échantillons. Puis un traitement DNase est appliqué pour éliminer l'ADN résiduel avant la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc). Le traitement DNase et la synthèse de l'ADNc ont été effectués en utilisant un protocole RQ1 RNase-Free DNase de la marque Promega.

### **II-2-3-Quantification de l'expression des gènes cibles**

Les ADNc synthétisés sont utilisés pour analyser l'expression des gènes cibles (Tableau 1) par une réaction de polymérisation en chaîne par transcription inverse (RT-qPCR) dans du LightCycler 480 instrument (Roche). Nous avons utilisé une plaque de 384 puits pour un volume final de 6 µl par puits. La qPCR est réalisée avec une solution mix contenant 2 µl d'ADNc de l'échantillon à analyser, de 3 µl de master mix de 0,2 µl de primer reverse, de 0,2 µl de primer forward ; le tout ajusté à un volume de 6 µl avec 0,6 µl d'H<sub>2</sub>O. Le programme qPCR est une dénaturation initiale à 95°C pendant 5 min, 45 à 50 cycles d'amplification (45 à 50 cycles à 95 ° C pendant 20 secondes, 60 ° C pendant 20 secondes et 72 ° C pendant 20 secondes), une courbe de fusion à 95°C pendant 1 min, et enfin le refroidissement à 40°C pendant 1 min. Les données sont analysées en utilisant le logiciel LightCycler 480 SW1.5 qui calcule l'efficacité de chaque échantillon et la méthode  $\Delta\Delta C_t$  (Livak et Schmittgen, 2001) pour analyser les données.

### **II-3-Hybridation *in situ***

Nous avons mis au point le protocole pour la première fois chez les bourgeons dormants du pommier dans le cadre de cette étude. Pour cette raison nous nous sommes limités à la variété GD et nous nous sommes focalisés sur la localisation des gènes *MdFT1*, *MdFT2*, *MdGH17b*. Les gènes *MdDAM* n'ont pas été pris en compte car ce sont des facteurs de transcription. Des

**Tableau 2** : : Amorces utilisées pour l'amplification de l'ADN, qui sera lui-même utilisé pour la transcription in vitro des sondes

|              |                 | Séquence  |
|--------------|-----------------|---|
|              | <b>T7</b>       | TAATACGACTCACTATAGGG                            |
| <b>FT1</b>   | MdFT1-sense-F1  | TAATACGACTCACTATAGGGCACGTTGTCGAAATTAAACGA       |
|              | MdFT1-anti-R1   | TAATACGACTCACTATAGGGAGCTTTTAGTCCGAGCCACA        |
| <b>FT2</b>   | MdFT2-sense-F1  | TAATACGACTCACTATAGGGGATGTGTGCGAACAACTGGT        |
|              | MdFT2-anti-R1   | TAATACGACTCACTATAGGGCACACGACACTTTTGTATTTAATTAGT |
| <b>GH17b</b> | MDP-147201sense | TAATACGACTCACTATAGGGAGTTCCGGTCGACATTTACG        |
|              | MDP-147201anti  | TAATACGACTCACTATAGGGTTGACGATGGACATGGCATA        |

études sur d'autres espèces montrent que leur niveau d'expression dans les tissus est très faible et difficile à mettre en évidence. Le choix des dates sélectionnées a été guidé par les résultats obtenus en RT-qPCR pour chacun de ces gènes. Pour la préparation des sondes une première PCR a été effectuée sur les séquences des 3 gènes à l'aide d'amorces spécifiques (tableau 1). Une deuxième PCR a été effectuée avec seulement les amorces spécifiques aux fragments T7 et les amorces reverses correspondantes afin d'augmenter le nombre de fragments contenant le T7. Ces produits PCR ont ensuite été transcrits à l'aide du kit Maxiscript T7 d'Ambion pour donner les sondes ARN anti-sens et sens marquées par des nucléotides dUTP-digoxigénine (tableau 2). Nous avons commencé par vérifier le marquage de ces sondes avec un anticorps anti-digoxigénine.

Cela consiste à mettre en contact ces sondes avec cet anticorps (anti-digoxigénin-AP ref 11-093-274-910, Roche) couplé à la phosphatase alcaline. Pour cela nous avons déposé 1 µl des dilutions 1/10, 1/100, 1/1000 des sondes marquées sur un petit rectangle de membrane nylon (type Hybond-N+, Amersham) ainsi qu'une sonde ARN marquée de concentration connue. Une fois déposés, les acides nucléiques sont fixés par les UV (312 nm) avec le Trans illuminateur à 100% pendant 2 min. La membrane est incubée avec une solution de blocage Roche (2 ml de solution de blocage 10% dans 20 ml de PBS 1X) pendant 30 min, sur agitateur. Ensuite, elle est incubée dans une solution d'anticorps anti-digoxigénine (conjugué Phosphatase Alcaline) dilué au 1/1000, dans du PBS 1X pendant 45 min, sur agitateur. Puis on la rince au Tris-HCl 0,1 M pH 7,5, NaCl 150 mM (3 x 10 min) et au Tris-HCl 0,1 M, pH 9,5, NaCl 100mM (1 x 10 min). La révélation se fera dans une solution de NBT/BCIP prête à l'emploi Sigma qui formera un précipité bleu ou violet si le marquage a fonctionné.

### **II-3-1-Méthode de fixation des bourgeons**

Après avoir enlevé leurs nombreuses écailles, les bourgeons sont placés dans du fixateur. La fixation des tissus végétaux est une étape essentielle qui permet de fixer les tissus dans l'état physiologique le plus proche de celui dans lequel ils étaient au moment de leur prélèvement. La solution de fixateur est préparée sous hotte au laboratoire et se compose de Paraformaldéhyde (PFA) à 8% dilué dans du tampon phosphate salin (PBS) additionné de quelques gouttes de Tween 80% (Protocole plateforme PHIV). Dès le retour au laboratoire, les échantillons sont placés sous une cloche à vide durant 5 heures puis mis dans une chambre froide à 4°C pendant 48 heures sur une table d'agitation. Ensuite viennent des étapes de



déshydratation au cours desquelles l'eau présente dans les bourgeons est remplacée par l'éthanol pour permettre la conservation des échantillons (Protocole plateforme PHIV).

### **II-3-2-Méthode de coupe des bourgeons**

Les bourgeons floraux déshydratés sont imprégnés puis inclus dans des blocs de paraffine (cf. annexes- inclusion de bourgeon en paraffine). Les blocs sont coupés par section de 10 µm au microtome (microtome Leica). Les coupes sont ensuite placées sur une lame de verre silanisée déposée sur une platine à 40°C pendant 2 heures avant d'être conservées dans une boîte au congélateur (-20°C). Avant de réaliser l'hybridation *in situ*, certaines coupes sont colorées à l'acridine orange pour s'assurer de la présence des ARN totaux dans les coupes.

### **II-3-3-Phases d'hybridation *in situ***

L'hybridation *in situ* elle-même démarre par le déparaffinage des lames. Cela consiste à éliminer la paraffine par des bains de Safesolv (4 X 10 mn), et une réhydratation via des bains successifs d'éthanol 100% (3 X 10 mn), d'éthanol 70% (1 X 2 mn), d'éthanol 50% (1 X 2 mn) et un rinçage à l'eau DEPC (2 X 2 mn). L'étape suivante est une déprotéinisation enzymatique avec la protéinase K. Cela consiste à traiter les lames avec une solution de protéinase K (1 ml/lame) incubé à 37°C pendant 30 min au thermocycleur. Ensuite, il faut à température ambiante des bains au tampon d'arrêt de la protéinase K (2 x 5 min) puis dans du PBS 1X à 0,2% glycine (1 x 2 min) et enfin un bain au PBS 1X (2 x 2 min). Les lames ont été ensuite déshydratées par des bains successifs d'1 min de 50%, 70% et 100% d'éthanol puis conservées à 4°C dans des vapeurs d'éthanol absolu le temps de préparer la solution d'hybridation.

Une fois les lames bien sèches, les chambres d'hybridation sont montées sur ces dernières, puis traitées avec 100 µl d'une solution mixte contenant 50 µl de Formamide déionisé, 10 µl de SSC 20x, 20 µl de Dextran sulfate 50%, 2 µl de solution Denhart 50%, 2 µl de sonde ARNt (50mg/ml) préalablement dénaturé à 80°C pendant 5 min, de 10 µl de la sonde du gène d'intérêt avec l'avoir dénaturée à 65°C pendant 8 min ; ajusté le tout avec 6 µl d'eau DEPC. Les lames ont ensuite été mises à incuber à 45°C pendant une nuit dans une atmosphère saturée en eau. Après incubation, une série de lavages post hybridation (cf. annexes- tableau 6) a été réalisée, suivie de 2 bains, le premier dans du tampon PBS 1 X (1 ml/lame) pendant 10 min et le second dans la solution de blocage diluée 10 fois dans du PBS 1X (1 ml/lame) à température ambiante pendant 1. Les lames ont ensuite été incubées dans une solution contenant de l'anti-digoxigénine-AP dilué au 1/500ème dans la solution de blocage (Blocking Buffer/PBS 1X) à 37°C pendant 1 h. La suite consiste à faire trois bains de PBS 1% à température ambiante



pendant 10 min suivi d'un bain de 10 min à température ambiante au Tris-HCl à pH 8,2 (0,1 M). La révélation se fait à l'obscurité grâce à une solution de Vector Blue (5 ml de Tris-HCl 100 mM pH 8,2 pour 2 gouttes du réactif 1, 2 gouttes du réactif 2, 2 gouttes du réactif 3), qui reste en contact de la lame pendant 3 h maximum, jusqu'à l'apparition du signal correspondant aux ARNs messenger des gènes cibles.

## **II-4-Etude du mouvement des solutés entre la tige et le bourgeon**

### **II-4-1-Etude du mouvement des solutés entre la tige et le bourgeon**

Nous avons étudié l'évolution des échanges entre la tige et le bourgeon au cours du temps grâce à la calcéine, tout au long de la dormance. La calcéine est un complexe de fluorescéine qui a la particularité de pouvoir circuler d'une cellule à l'autre (Rinne et al. 2011). Les prélèvements ont été réalisés une fois par mois durant la période supposée de transition entre paradormance et endodormance (octobre, novembre) puis toutes les semaines au cours du mois de janvier jusqu'à début février. C'est en effet à cette période que se réalise classiquement la transition entre l'endodormance et l'écodormance (tableau annexe). Pour chaque génotype de pommier (GD, PL, Rn), un contrôle négatif a été réalisé avec deux rameaux courts (4-5cm) portant un bourgeon floral qui ont été placés dans de l'eau. Les autres rameaux ont été placés chacun 24h dans un tube contenant 2 ml de calcéine 0.1% (0.1g pour 100ml d'eau). Nous avons fait très attention à ce que seule la base du bourgeon soit en contact avec la solution de calcéine pour ne pas fausser l'étude. Les tubes ont été recouverts de papier d'aluminium et placés à l'obscurité pour ne pas exposer le fluorochrome à la lumière. Nous avons coloré trois bourgeons par variété et par date de façon à avoir des répétitions techniques. Après la coloration, les bourgeons sont divisés longitudinalement en deux parties égales à l'aide d'un scalpel. Ils ont été ensuite observés à la loupe binoculaire à fluorescence avec le microscope MVX10 (Olympus® macro zoom fluorescence) face coupée dirigée l'objectif. A l'aide du logiciel ImageJ, nous avons estimé la diffusion de la calcéine au sein de chaque échantillon. Nous avons calculé le rapport entre la surface occupée par la fluorescence dans le bourgeon et la surface totale de celui-ci en délimitant les aires fluorescentes des non-fluorescentes grâce à un seuillage automatique appliqué à chaque image par la commande Threshold.

### **II-4-2-Etude de la dynamique de dépôts de callose**

Les bourgeons sont placés dès leur prélèvement au verger dans une solution de fixateur composé de paraformaldéhyde (PFA) à 20%, de glutaraldéhyde à 50% et de caféine. Dès le retour au laboratoire, il faut ajouter quelques gouttes de tween (TWEEN® 20 Sigma-



Aldrich) et les placer sous vide séquentiel pendant 6 heures. Les tubes sont ensuite mis en chambre froide à 4°C pendant 48 heures sur une table d'agitation. Les échantillons sont ensuite progressivement déshydratés par des rinçages successifs à l'éthanol 50% et 70%. Ils sont conservés ensuite à 4°C dans l'éthanol 70% pour l'étude en histologie.

### **II-4-3-Reconstruction en 3D du bourgeon de pommier**

La reconstruction en 3D du bourgeon de pommier a été réalisée pour observer la présence des dépôts de callose dans toutes ces structures. Deux bourgeons de pommier Golden Delicious (prélèvement du 05/02/2018) ont été inclus dans de l'agarose à 5%. Ils ont été coupés l'un transversalement, l'autre longitudinalement à l'aide d'un vibratome couplé au microscope confocal ZEISS LSM 880. Les images des coupes transversales et longitudinales ont été réalignées avec le logiciel Imarix pour la reconstruction en 3 dimensions.

### **II-4-4-Observation des dépôts de callose**

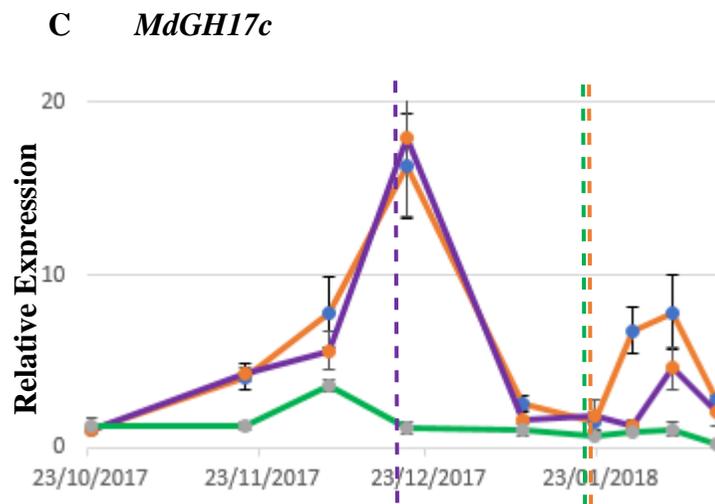
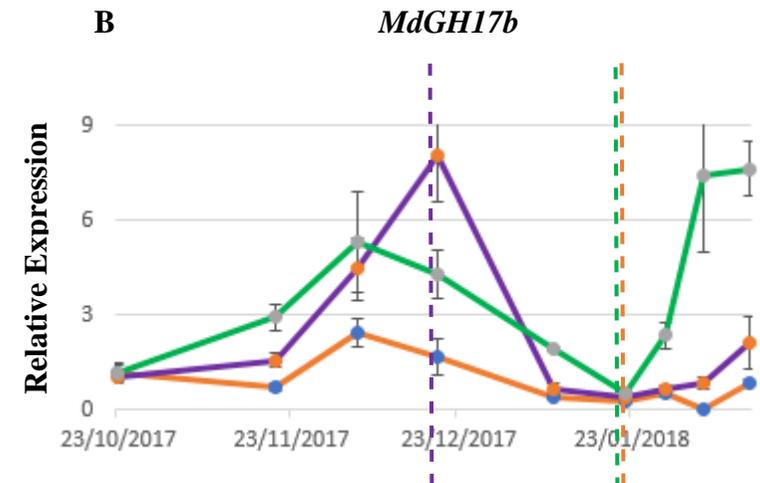
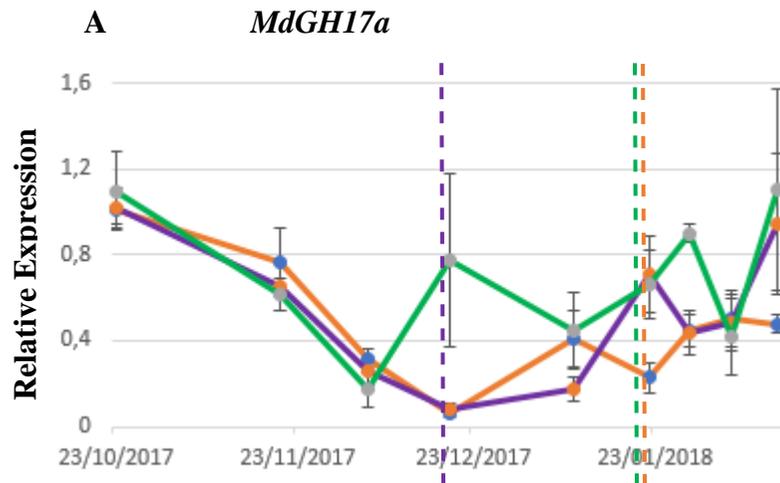
Pour observer ces dépôts de callose dans les tissus et notamment au niveau des plasmodesmes des cellules de bourgeon de pommier, des coupes histologiques (longitudinales et transversales) ont été réalisées avec un vibratome (HM 650 V Microtome, Thermo Scientific). Pour les coupes longitudinales, les échantillons sont placés horizontalement sur le support, coté tige vers la lame. Pour les coupes transversales ils sont placés verticalement, la base collée sur le plot et la pointe vers le haut. Les paramètres de coupes au vibratome sont présentés dans le tableau 4 (cf.annexes). Les coupes sont ensuite colorées au Bleu d'aniline (cf. annexes-tableau 5) pendant 15 min pour observer les dépôts de callose. Les coupes colorées sont montées ensuite entre lame et lamelle dans de l'eau. L'observation a été faite au microscope DM4500 LEICA à l'objectif X20 pour toutes nos coupes (transversales et longitudinales).

## **III-Résultats**

### **III-1-Etude des gènes candidats impliqués dans la dormance hivernale du pommier**

#### **III-1-1-Profiles d'expression des gènes qui code $\beta$ -1,3-glucanases**

Des études conduites sur le peuplier ont montré que plusieurs gènes de la famille des GLUCANES HYDROLASES 17 (*GHI7*) pourraient être impliqués dans le contrôle de la dormance Rinne et al ,2001, 2011). Des orthologues de ces gènes ayant été identifiés dans le génome de pommier, j'ai quantifié le niveau des transcrits de trois gènes *MdGHI7* (*MdGHI7a*, *GHI7b*, *GHI7c*) pour voir si les mêmes types d'observation pouvait être faite chez le pommier. Le niveau d'expression de *MdGHI7a* pour les génotypes GD et Pink Lady PL diminue du 23



● Golden Delicious  
● Pink lady  
● reinette

**Figure 7 :** Profils d'expression des gènes candidats de  $\beta$ -1,3-glucanases (*GH17*) de trois génotypes de pommier dans des bourgeons dormants. Les bourgeons sont prélevés en verger d'expérimentation en condition naturelle du 23 octobre 2017 au 13 février 2018. Les deux premières dates de prélèvements sont réalisées à intervalle de 1 mois, du deuxième prélèvement au cinquième prélèvement se trouve des intervalles de 2 semaines et du prélèvement de la date 5 au dernier prélèvement se trouve des intervalles de 1 semaine. Le profil d'expression de ces gènes est établi par RT-qPCR. En orange : profil d'expression pour le pommier *Golden Delicious* ; en violet : profil d'expression pour le pommier *Pink Lady* ; en vert : profil d'expression pour le pommier *Reinette*. Les barres d'erreurs sont des écarts types de la moyenne (n=9). Les traits en pointillés représentent les dates de levée d'endormance estimées pour chaque génotype de pommier grâce aux tests de Tabuenca réalisés par I. Farrera (communication personnelle)

octobre jusqu'au 23 décembre (figure 7A). Puis son expression augmente légèrement jusqu'au 13 février (figure 7A). L'expression de ce gène pour le génotype Reinette (Rn) diminue du 23 octobre jusqu'au 05 décembre. Son expression va ensuite augmenter jusqu'au 13 février avec deux pics d'expression respectivement le 23 décembre et fin janvier (figure 7A). Le niveau d'expression de *MdGH17b* pour les génotypes GD et PL augmente du 23 novembre jusqu'à atteindre respectivement un pic d'expression le 05 décembre et le 22 décembre (figure 7B). Puis son expression diminue jusqu'au 13 février pour les deux variétés. L'expression de ce gène pour le génotype Rn augmente entre le 23 octobre et le 23 décembre (figure 7B). Le niveau de son expression va ensuite chuter jusqu'au 22 janvier avant d'augmenter jusqu'au 13 février.

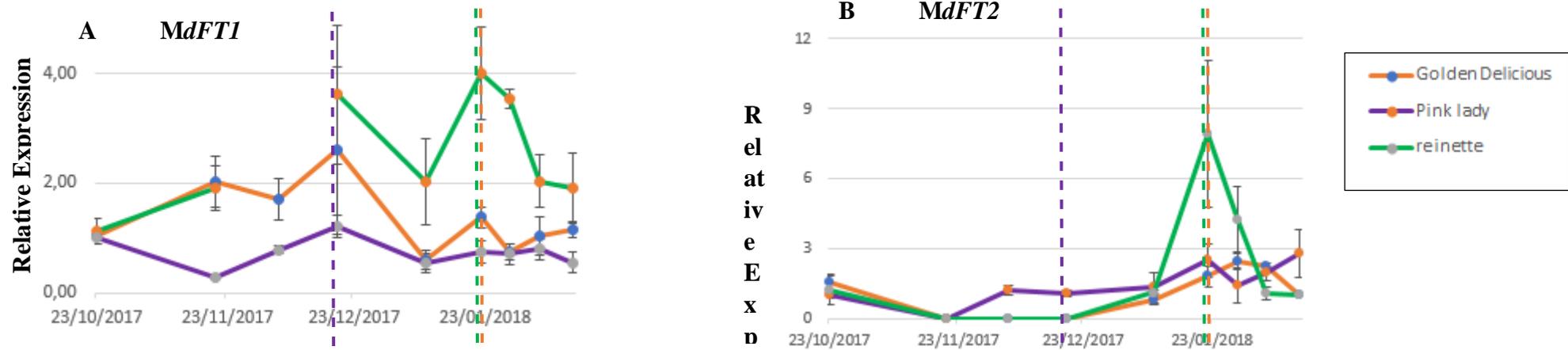
Le gène *MdGH17c* présente pour les génotypes GD, PL un niveau d'expression qui augmente du 23 octobre jusqu'au 23 décembre (figure 7C). Puis son expression va chuter jusqu'au 22 janvier avant d'augmenter légèrement entre le 22 janvier et le 05 février pour à nouveau chuter le 13 février (figure 7C). L'expression de *MdGH17c* pour le génotype Rn augmente dès le 23 novembre pour atteindre un pic le 05 décembre. Son expression va ensuite chuter jusqu'au 13 février.

### **III-1-2-Profils d'expression des gènes *FT***

Nous avons effectué des analyses de transcrit de *MdFT1* et *MdFT2* sur des prélèvements réalisés du 23 octobre 2017 au 13 février 2018. L'expression de *MdFT1* pour les génotypes GD et PL augmente dès le 23 octobre pour atteindre un pic le 23 décembre (figure 8A). Puis son expression diminue jusqu'au 13 février avec un léger pic d'expression le 22 janvier pour le génotype GD. L'expression de *MdFT1* pour le génotype Rn augmente dès le 23 octobre pour atteindre deux pics d'expression respectivement le 23 décembre et le 23 janvier (figure 8A). Puis son expression chute jusqu'au 13 février. L'expression de *MdFT2* diminue du 23 octobre au 23 novembre (figure 8B). Puis son expression reste faible jusqu'au début du mois de janvier. L'expression du gène va ensuite augmenter jusqu'à atteindre un pic d'expression le 22 janvier pour les génotypes Rn et PL et un pic le 29 janvier le génotype GD. A partir de ces dates, son expression va chuter jusqu'au 13 février.

### **III-1-3-Profils d'expression des gènes *DAM***

Nous avons quantifié le niveau d'expression des gènes *MdDAM1*, *MdDAM2*, *MdDAM4* qui sont des facteurs de transcription MADS-box qui pourraient être impliqués dans le contrôle de la dormance des pommiers (figure 9). Le niveau d'expression de *MdDAM1* a augmenté du 23 octobre au 23 décembre pour les trois génotypes (figure 9A). Puis son expression diminue



**Figure 8** : Profils d'expression de gène de promoteur floral *Flowering Locus T (FT)* que sont *MdFT1* et *MdFT2* de trois génotypes de pommier dans des bourgeons dormants. Les bourgeons sont prélevés en verger d'expérimentation en condition naturelle du 23 octobre 2017 au 13 février 2018. Les deux premières dates de prélèvements sont réalisées à intervalle de 1 mois, du deuxième prélèvement au cinquième prélèvement se trouve des intervalles de 2 semaines et du prélèvement de la date 5 au dernier prélèvement se trouve des intervalles de 1 semaine. Le profil d'expression de ces gènes est établi par RT-qPCR. En orange : profil d'expression pour le pommier *Golden Delicious* ; en violet : profil d'expression pour le pommier *Pink Lady* ; en vert : profil d'expression pour le pommier *Reinette*. Les barres d'erreurs sont des écarts types de la moyenne (n=9). Les traits en pointillés représentent les dates de levée d'endormance estimées pour chaque génotype de pommier grâce aux tests de Tabuenca réalisés par I. Farrera (communication personnelle)

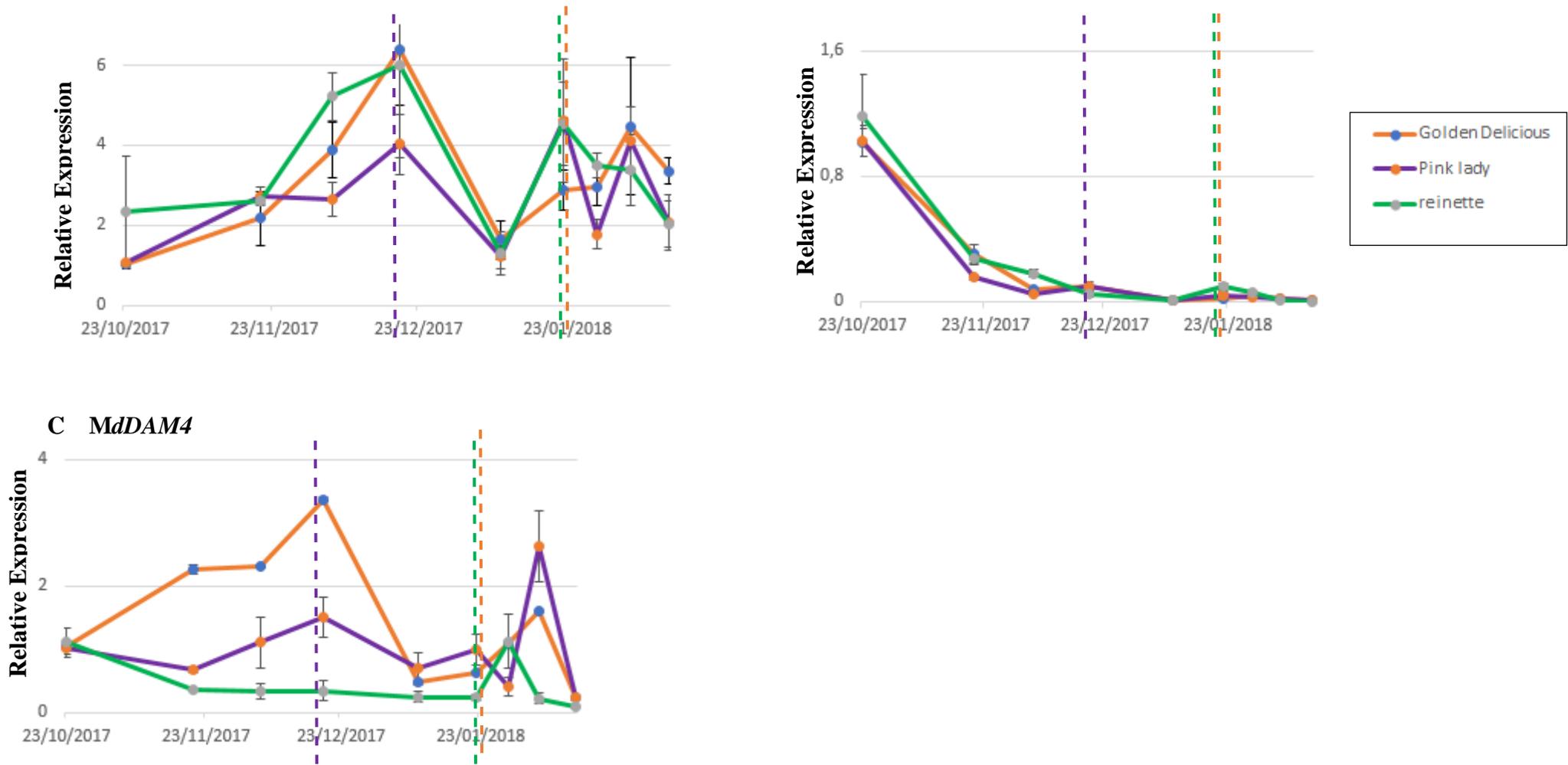
progressivement jusqu'au 13 février. Nous avons observé pour les trois génotypes de pommier (GD, PL, Rn) les plus importants niveaux d'expression de *MdDAM2* le 23 octobre et une diminution progressive jusqu'au 13 février (figure 9B). Le niveau d'expression de *MdDAM4* augmente respectivement à partir 23 octobre pour le génotype GD et le 23 novembre pour PL jusqu'à atteindre un pic d'expression le 23 décembre. Puis son expression diminue jusqu'au 13 février pour les deux génotypes. L'expression de *MdDAM4* pour le génotype Rn diminue dès le 23 octobre et maintien des niveaux d'expression très faible jusqu'à la fin du mois de janvier. Son expression va légèrement augmenter au début du mois de février pour à nouveau chuter le 13 février (figure 9C).

### **III-2-Hybridation *in situ***

La sonde anti-sens ribonucléiques 18S permet de révéler que l'ARN ribosomique est présent dans le cytoplasme et les transcrits sont présents dans tous les tissus du bourgeon de pommier Golden Delicious : les étamines, les ovaires, les pétales, les sépales, le procambium et le parenchyme (figure 10). La sonde anti-sens *MdFT1* montre un marquage spécifique des transcrits du gène *MdFT1* au niveau des zones méristématiques qui donnent naissance aux étamines et aux carpelles (figure 11). Le niveau de marquage est faible mais relativement homogène. La sonde anti-sens du gène *MdGHI7b* met en évidence un marquage des transcrits du gène se situant au niveau des cellules méristématiques qui donnent naissance aux étamines et aux carpelles et une plus faible présence au niveau du procambium qui donnera naissance au système vasculaire (figure 12 et figure 13).

### **III-3-Etude des flux entre la tige et le bourgeon**

Sur la base des études conduites sur le peuplier (Rinne et al, 201) nous avons évalué l'évolution de la connectivité des tissus vasculaires au sein des bourgeons et entre le rameau et le bourgeon durant l'endormance et le début de l'écodormance. L'observation pour la variété Pink Lady s'est relevée très délicate car les bourgeons sont très petits et comportent beaucoup de poils. Du fait d'une incertitude d'observation très importante, seuls les photos obtenues pour GD et Rn ont été traitées. L'évolution du rapport entre la surface occupée par la fluorescence dans le bourgeon et la surface totale de celui-ci augmente de façon graduelle avec l'avancé de la période de dormance pour les deux génotypes (figure 14). Pour la figure 14B le flux de calcéine dans les tissus de GD reste constant de novembre jusqu'au début du mois de janvier. Puis ce flux augmente du 22 janvier jusqu'au mois de février.



**Figure 9 :** Profils d'expression des gènes *MdDAM1*, *MdDAM2* et *MdDAM4* de trois génotypes de pommier dans des bourgeons dormants. Les bourgeons sont prélevés en verger d'expérimentation en condition naturelle du 23 octobre 2017 au 13 février 2018. Les deux premières dates de prélèvements sont réalisées à intervalle de 1 mois, du deuxième prélèvement au cinquième prélèvement se trouve des intervalles de 2 semaines et du prélèvement de la date 5 au dernier prélèvement se trouve des intervalles de 1 semaine. Le profil d'expression de ces gènes est établi par RT-qPCR. En orange : profil d'expression pour le pommier *Golden Delicious* ; en violet : profil d'expression pour le pommier *Pink Lady* ; en vert : profil d'expression pour le pommier *Reinette*. Les barres d'erreurs sont des écarts types de la moyenne (n=9). Les traits en pointillés représentent les dates de levée d'endodormance estimées pour chaque génotype de pommier grâce aux tests de Tabuenca réalisés par I. Farrera (communication personnelle)

### **III-4-Etude la dynamique de déposition de callose**

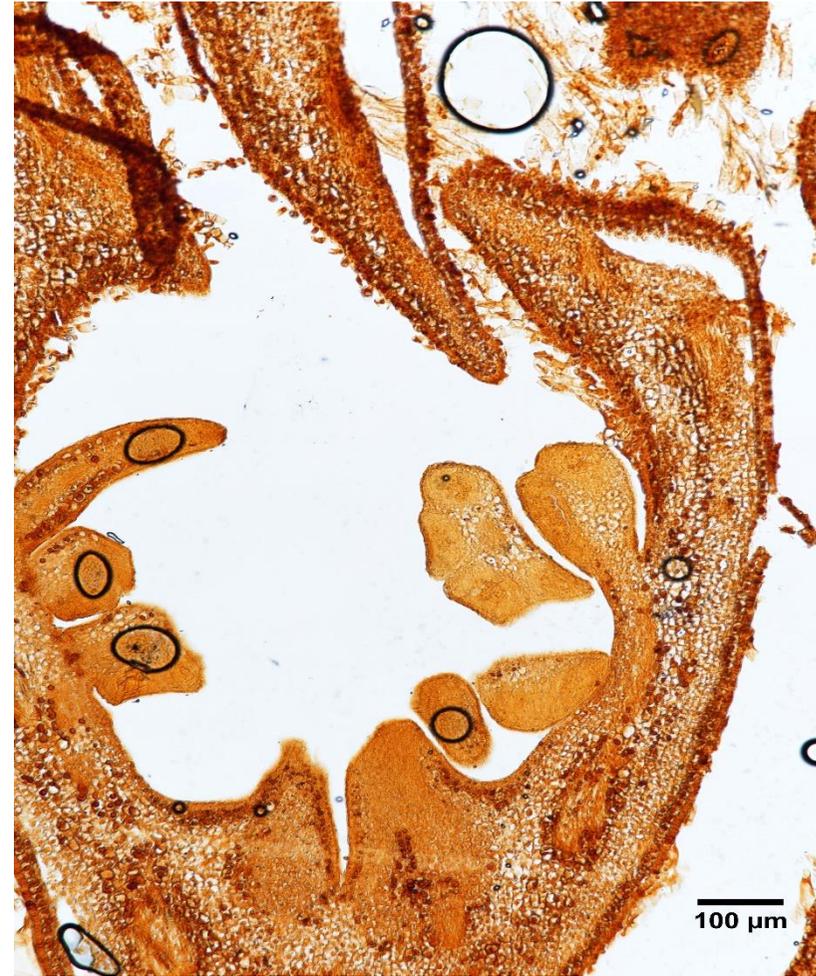
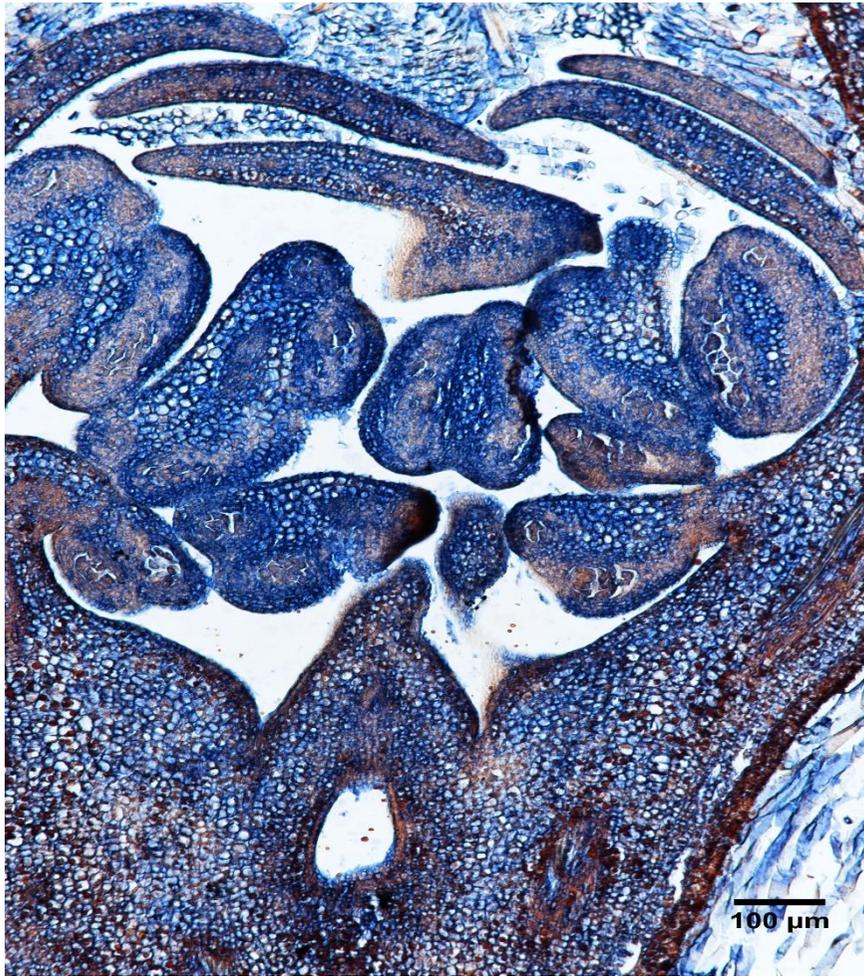
Dans cette partie seule les travaux préliminaires ont été réalisés. L'analyse de la reconstruction d'image 3D montre des dépôts de callose au niveau des tubes du phloème (figure 16 cf annexe). Cette reconstruction en 3D qui a servi dans le choix des paramètres de coupes. Nous avons ajouté quelques photos issues des coupes en annexe. Sur ces photos on remarque également que la callose se situe au niveau des cellules des tubes du phloème (figure 17 cf annexe)

### **IV-Discussions**

Le cycle de vie des arbres des climats tempérés, dont le pommier, est lié aux changements saisonniers qui leur permettent entre autres d'entrer et de sortir de la dormance et à l'intérieur des bourgeons, ce mécanisme physiologique et moléculaire est contrôlé de façon distincte. Durant la dormance les bourgeons sont isolés du reste de la plante par un mécanisme impliquant la mise en place des dépôts de callose localisés au niveau des plasmodesmes (Rinne et al., 2001). Un refroidissement suffisant est nécessaire pour provoquer l'hydrolyse des dépôts de callose et rétablir les communications symplasmiques dans l'apex et le phloème (Aloni et Peterson, 1997, Rinne et al., 2001). De plus, les basses températures régulent également la transcription de plusieurs gènes impliqués dans le contrôle de la dormance des bourgeons. Certains de ces gènes (*GHI7*, *FT* et *DAM*) ont été intégrés dans des modèles qui tentent d'expliquer le mécanisme de contrôle moléculaire de la dormance chez différentes espèces végétales, comme le peuplier et la pêche (Rinne et al., 2011 ; Yamane, 2014). Bien que des études aient identifiées un certain nombre de gènes qui sont impliqués dans le contrôle de la dormance (Paul et al., 2014), ce mécanisme reste peu caractérisé au niveau cellulaire et moléculaire notamment chez le pommier. Afin de mieux comprendre le cycle de dormance des bourgeons chez le pommier, j'ai caractérisé au cours de ce stage les profils d'expression des gènes *GHI7*, *FT* et *DAMs* et analysé le stade physiologique du bourgeon au cours de ce processus.

#### **IV-1-Expression de *MdGHI7a*, *MdGHI7b*, *MdGHI7c* et leur localisation**

Certains groupes de *GHI7* identifiés chez le peuplier (Rinne et al 2011) possèdent une ancre de glycosylphosphatidylinositol (GPI) et un domaine CBM34 qui leur permettent de se lier à la membrane plasmique ou aux plasmodesmes (Levy et al., 2007, Simpson et al., 2009). Au cours de la dormance, l'accumulation des températures froides induisent des augmentations des niveaux d'expression de ces gènes, ce qui provoque une hydrolyse des dépôts de callose localisés au niveau des plasmodesmes (Rinne et al., 2001) et



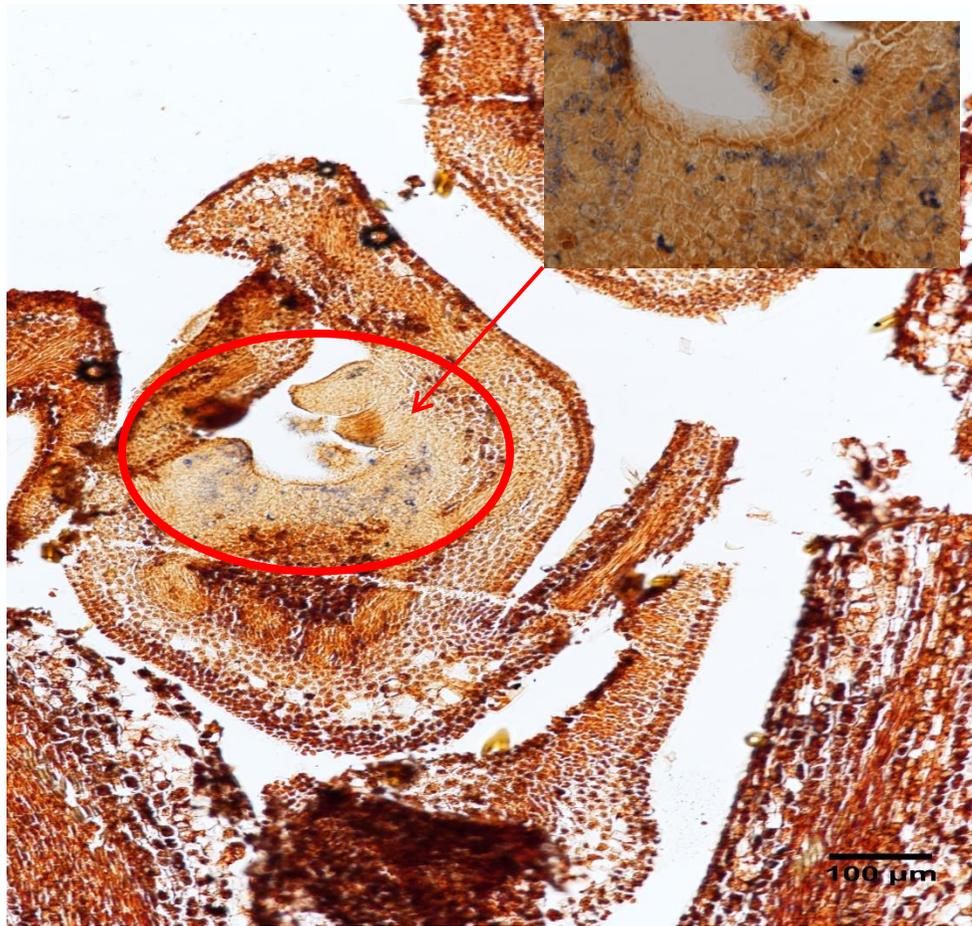
**Figure 10** : Localisation des transcrits de la sonde ribonucléique 18S des bourgeons dormants de pommier Golden Delicious. Les signaux bleus correspondent à la localisation par hybridation *in situ* de cette sonde. Les bourgeons dormants utilisés sont issus des prélèvements en vergers d'expérimentation du 23 octobre 2017. Les bourgeons sont inclus dans du parrafine puis coupés au microtomes Leica avec comme épaisseur de coupes 10µm. A gauche se trouve la sonde anti-sens et à droite la sonde sens. La barre d'échelle est 100 µm

donc la réouverture des voies de communication symplastiques (van der Schoot et al., 2011). Nous avons caractérisé le profil d'expression de trois gènes *GHI7* du pommier que sont *MdGHI7a*, *MdGHI7b*, *MdGHI7c* qui font partie du groupe 1 décrit chez le peuplier. Nos résultats montrent un pic d'expression pour les gènes *MdGHI7b* et *MdGHI7c* après exposition aux températures froides. Cela suggère que l'expression de ces gènes est induite par des températures froides. Ce qui est en accord avec le comportement des gènes *GHI7* du groupe 1 possédant un domaine GPI décrit chez le peuplier (Rinne et al., 2011). Les gènes *MdGHI7* du pommier pourraient avoir des fonctions similaires à celles des *GHI7* décrits chez le peuplier.

Des tests de forçage de type Tabuenca (Tabuenca, 1964), conduits au sein de l'équipe AFEF durant cet hiver, ont permis de déterminer la date de levée d'endodormance pour les trois variétés étudiées dans le cadre de mon stage. La date de la levée de l'endodormance est estimée entre le 12 et le 22 décembre pour PL et entre le 15 et le 22 janvier pour GD et Rn. Le pic d'expression des gènes *MdGHI7b* et *MdGHI7c* pour GD et Rn intervient à priori avant la levée de l'endodormance. Cela pourrait indiquer que l'hydrolyse de la callose intervient avant la levée de l'endodormance pour le promouvoir. Cette observation est en adéquation avec mon résultat du flux de calcéine chez GD. En effet à partir du 22 janvier, lorsque l'endodormance est levée pour GD, le flux de ce marqueur fluorescent devient significativement plus important de la base du bourgeon vers les parties méristématiques pour le génotype GD. Ceci indique que la communication symplastique est rouverte après cette date, probablement par la réduction des dépôts de callose aux niveaux des plasmodesmes.

La variété *PL* étant une variété à floraison précoce, nous pouvions penser que le pic d'expression de *MdGHI7b* et *MdGHI7c* pour cette variété serait antérieur à celui du génotype *GD*. Mais le pic d'expression de ces gènes est synchrone avec la levée de l'endodormance de *PL* (Figure 7B et 7C). Il semble donc que *PL*, qui est une variété plus précoce que *GD* et *Rn*, ne nécessite pas un haut niveau d'expression des gènes *MdGHI7b* and *MdGHI7c* pour que sa phase d'endodormance soit levée.

L'hybridation *in situ* réalisée sur bourgeons dormant de pommier *GD* localise *MdGHI7b* dans la partie méristématique qui donne naissance aux étamines, aux carpelles et dans le procambium. Le procambium correspond aux tissus méristématiques qui mettent en place le xylème et le phloème. L'ensemble de nos résultats suggèrent que sous l'action des températures froides le gène de *MdGHI7b*, présent au niveau du procambium provoquerait alors l'hydrolyse des dépôts de callose et donc la réouverture des voies de communication symplasmiques.



**Figure 11 :** Localisation des transcrits du gène *MdFT1* dans les bourgeons dormants du pommier Golden Delicious. Les signaux bleus correspondent à la localisation par hybridation *in situ* du gène. Les bourgeons dormants utilisés sont issus des prélèvements en vergers d'expérimentation du 23 novembre 2017. Les bourgeons sont inclus dans du parrafine puis coupés au microtome Leica avec comme épaisseur de coupes 10µm. A gauche se trouve la sonde anti-sens et à droite la sonde sens. Le cercle rouge délimite la zone de présence du signal. La barre d'échelle est 100 µm.

Le profil d'expression obtenu pour *MdGH17a* dans le cadre de notre étude n'est pas conforme à celui attendu pour les *GHI7* avec un domaine GPI identifié chez le peuplier (Rinne et al., 2011). On pourrait dire que ce *MdGH17a* n'aurait pas d'action dans le mécanisme de dormance du pommier. Ce *MdGH17a* pourrait être impliqué dans d'autres mécanismes par exemple les réactions de défense (Lee and Lu, 2011).

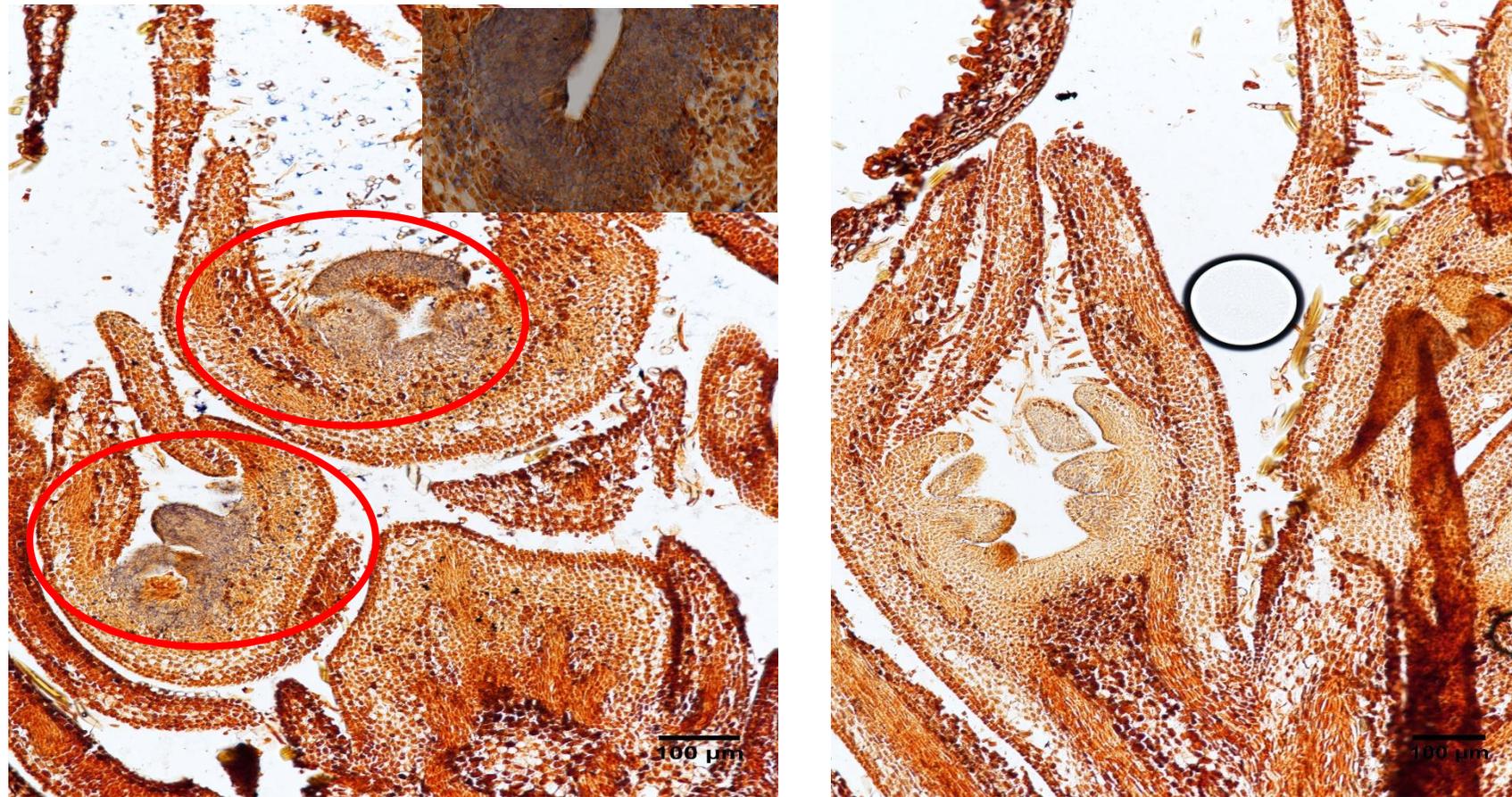
#### **IV-2- Expression de *FT1*, *FT2* et leur localisation**

Chez le peuplier, il ressort qu'au cours de l'hiver la transcription de *FT1* initie la transition des méristèmes végétatifs à la phase reproductrice, alors que *FT2* est réprimée afin de contrôler la croissance végétative (Hsu et al., 2011). Il existe également deux gènes *FT* chez le pommier, *MdFT1* et *MdFT2*, qui sont impliqués dans la régulation de la floraison (Kotoda et al., 2010 ; Tränkner et al., 2010). J'ai donc étudié le profil d'expression de ces deux gènes dans le cadre de mon stage. Le profil d'expression de *MdFT2* affiche un pic d'expression après la levée de l'endodormance. Ce résultat de transcription de *MdFT2* est en accord avec les résultats de Kotoda et al (2010). Mais les résultats obtenus pour les transcrits de *MdFT1* sont difficilement interprétables au vu des travaux de Kotoda et al (2010).

Notre recherche de localisation tissulaire dans les bourgeons dormants de pommier GD par hybridation *in situ* nous a permis de trouver les signaux des transcrits de *MdFT1* dans les zones méristématiques qui donnent naissance aux étamines et aux carpelles. Le même résultat a été trouvé par RT-qPCR par Kotoda et al (2010). Les transcrits de *MdFT1* se trouveraient principalement dans les organes floraux, telles que les étamines. Pour des raisons techniques (mauvaise sonde, hybridation non spécifique etc..) la localisation de *MdFT2* n'a pas été mise en évidence. Mon résultat et les études antérieures suggèrent que ces deux gènes bien qu'étant des homologues joueraient des rôles différents dans le développement reproductif et auraient des réseaux de régulations différents. Leurs expressions spatiales et temporelles suggèrent aussi que *MdFT2* jouerait un rôle dans le débourrement après la levée de l'endodormance et que *MdFT1* aurait un rôle dans la transition et le développement floral. Ce qui est en accord avec les travaux de Kotoda et al (2010).

#### **IV-3-Expression de facteurs de transcription *MdDAM1*, *MdDAM2*, *MdDM4***

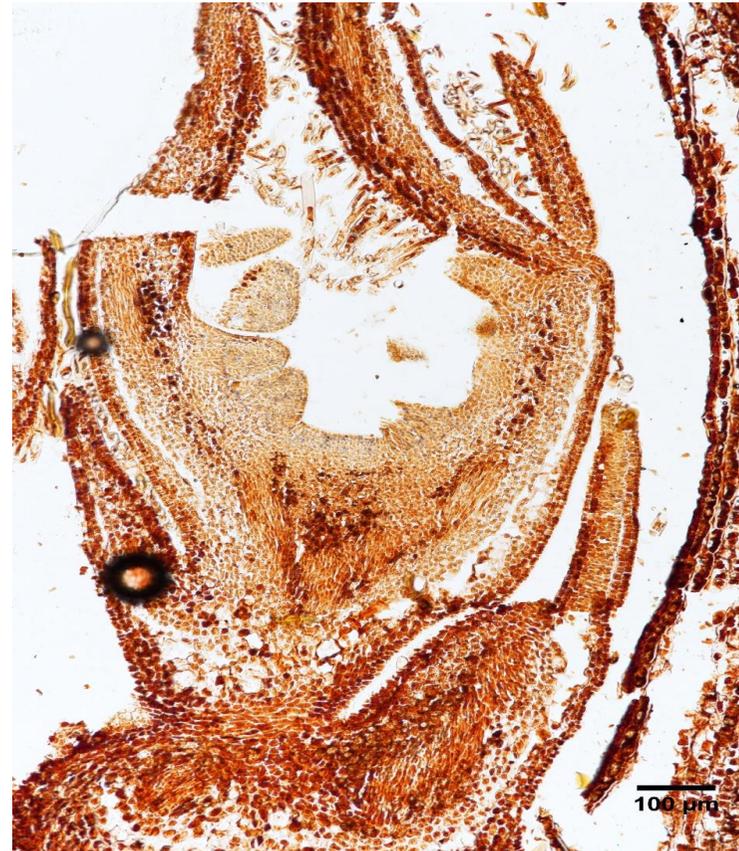
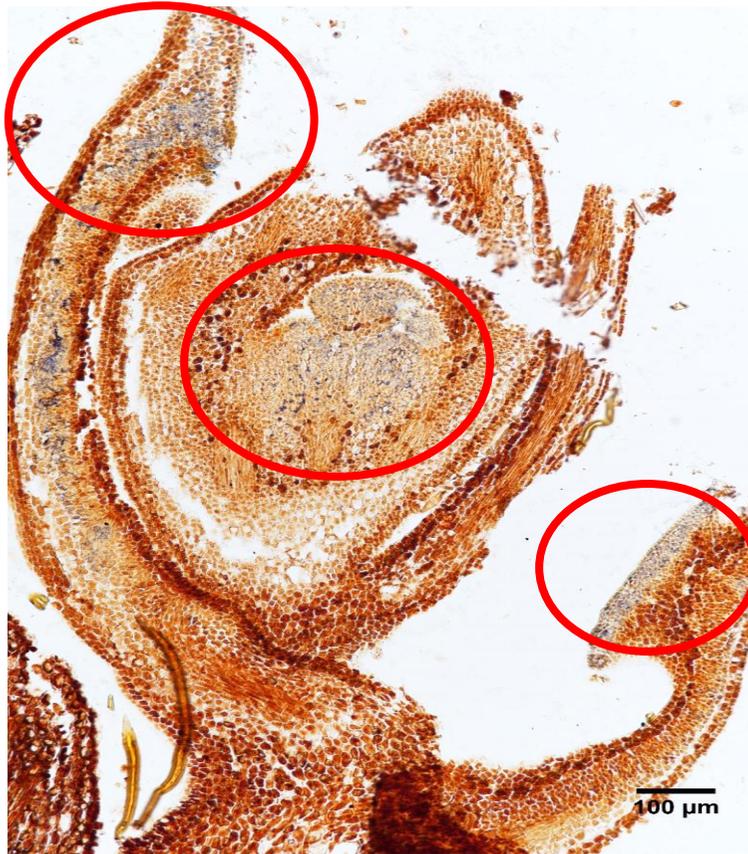
Ces gènes *DAM* semblent avoir des rôles importants dans la régulation, la cessation de la croissance et la formation des bourgeons terminaux du pêcher (Li et al., 2009). Pour comprendre le rôle de trois orthologues des gènes *DAM* du pommier (*MdDAM1*, *MdDAM2*, *MdDAM4*), nous avons quantifié leur expression pendant la période de dormance hivernale



**Figure 12 :** Localisation des transcrits du gène *MdGH17b* des bourgeons dormants de pommier Golden Delicious. Les signaux bleus correspondent à la localisation par hybridation du gène. Les bourgeons dormants utilisés sont issus des prélèvements en vergers d'expérimentation du 05 décembre 2017. Les bourgeons sont inclus dans du parrafine puis coupés au microtome Leica avec comme épaisseur de coupes 10µm. A gauche se trouve la sonde anti-sens et à droite la sonde sens. Le cercle rouge délimite la zone de présence du signal. La barre d'échelle est 100 µm.

(figure 9). Nos résultats montrent que l'expression de *MdDAM2* diminue durant la dormance ce qui n'est pas le cas de *MdDAM1* et *MdDAM4* dont les expressions augmentent pendant cette période. Ce résultat est en accord avec les résultats des études antérieures trouvées dans la littérature (Li et al., 2009 ; Niu et al., 2016). En effet, *DAM2* s'exprime durant l'été et serait réprimé par le froid automnal alors que l'expression de *DAM1* et *DAM4* pourrait être induite par le froid jusqu'à ce que le bourgeon accumule assez de quantité de froid pour voir sa période d'endormance levée. On remarque également une synchronisation de leurs expressions qui semble coïncider avec l'arrêt de la croissance due à l'endormance profonde. Ce qui correspond à une régulation positive de la dormance. Ces trois gènes, et en particulier *MdDAM1* et *MdDAM4*, pourraient être des candidats probables du contrôle de la dormance du pommier. Des résultats similaires ont été observés antérieurement par Mimida et al (2015) chez lesquels *DAM1* et *DAM4* s'expriment fortement pendant la période de dormance et voient leur expression diminuer avec la levée de l'endormance. Signalons que l'expression de *MdDAM4* pour la variété Rn reste étrangement faible et constante durant toute la période d'endormance. On peut donc supposer que la phase de dormance ne serait pas contrôlée par le gène *MdDAM4* chez reinette mais par un autre gène *DAM*.

En combinant nos résultats et les données de la littérature sur la tolérance au froid des arbres des climats tempérés, nous proposons un modèle d'un mécanisme moléculaire de régulation de la dormance hivernale du pommier GD basée les gènes *MdDAM* (figure 15). Ces *MdDAM* pourraient réguler le maintien et la levée de l'endormance des bourgeons du pommier. Dans ce modèle, l'exposition au froid induit l'expression des gènes *DAM* (*MdDAM1* et *MdDAM4* probablement par activités des facteurs de transcription C-repeat binding factor (CBF) (Chinnusamy et al., 2007). Ce niveau d'expression pendant l'hiver pourrait inhiber l'expression de *MdFT2* pour maintenir le bourgeon en endormance. Ce qui semble être soutenue par les résultats d'une étude récente sur le poirier où il avait été montré que *DAM* réprime l'expression de *FT* (Niu et al., 2016). D'autre part, le froid pourrait activer et réguler l'expression des gènes *GHI7*. Bien qu'il ne puisse pas être exclu, actuellement il n'y a pas de preuve que la régulation de *GHI7* est médiée par l'activité des facteurs de transcription *DAM*.

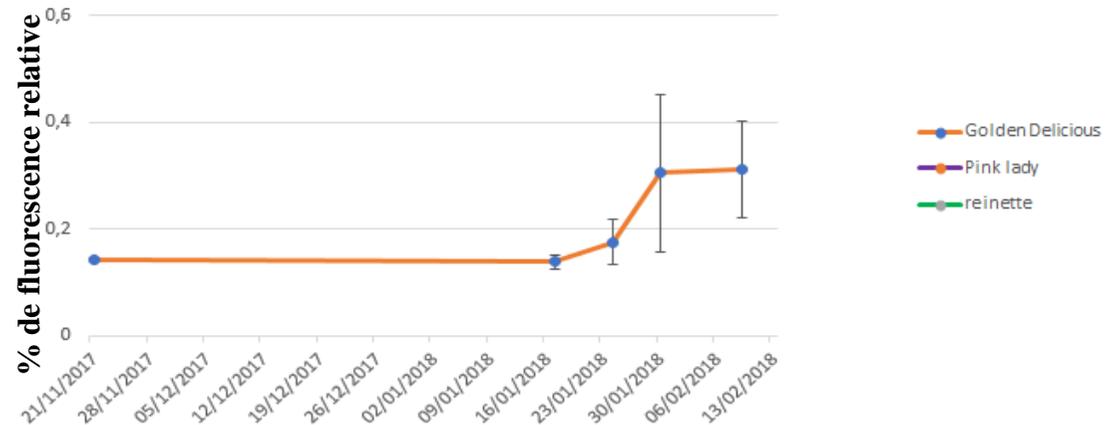
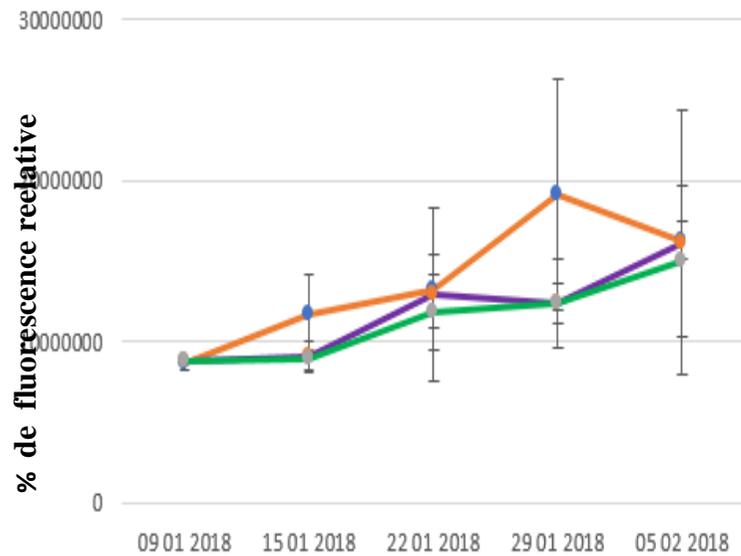


**Figure 13** : Localisation des transcrits du gène *MdGHI7b* des bourgeons dormants de pommier Golden Delicious. Les signaux bleus correspondent à la localisation par hybridation du gène. Les bourgeons dormants utilisés sont issus des prélèvements en vergers d'expérimentation du 19 décembre 2017. Les bourgeons sont inclus dans du paraffine puis coupés au microtome Leica avec comme épaisseur de coupes 10µm. A gauche se trouve la sonde anti-sens et à droite la sonde sens. Le cercle rouge délimite la zone de présence du signal. La barre d'échelle est 100 µm

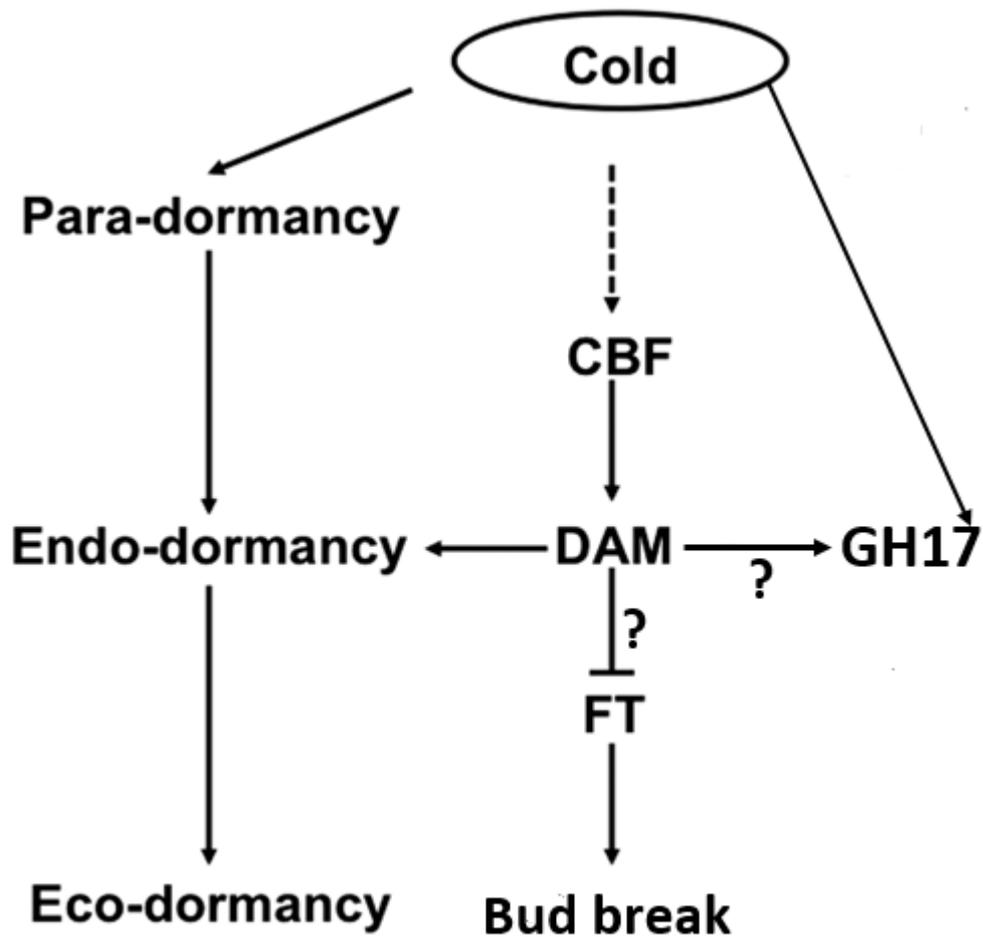
## **Conclusions et perspectives**

Dans ce travail, j'ai caractérisé le profil d'expression de plusieurs gènes impliqués dans la dormance. Mes résultats indiquent que les gènes *MdGH17*, *MdFT* et *MdDAM* pourraient jouer un rôle dans le processus de dormance hivernale des bourgeons du pommier. Les gènes *MdGH17b* et *MdGH17c*, pourraient être impliqués dans l'élimination des dépôts de calloses des plasmodesmes, ce qui est un processus physiologique crucial pour la levée de l'endodormance et la croissance de ces bourgeons. De plus, les gènes *MdDAM* et *MdFT2* pourraient aussi avoir respectivement des rôles importants dans le maintien de l'endodormance et le débourrement. Toutes ces conclusions sont basées sur des expériences réalisées en une année d'étude. Afin de confirmer ces résultats, il faudra à nouveau étudier le profil d'expression de ces gènes candidats (*DAM*, *FT*, *GH17*) au cours d'une seconde année d'étude.

Ces données devraient être complétées par une caractérisation plus détaillée de la dynamique des dépôts de callose dans les plasmodesmes au cours de la dormance. J'ai initié la caractérisation de la dynamique des dépôts de callose en réalisant une reconstruction en 3D du bourgeon du pommier afin de cibler les endroits idéals pour les coupes et la quantification de la callose. Ce travail m'aurait permis d'établir une dynamique de dépôt de callose au niveau des plasmodesmes. Cela pourrait permettre de savoir si la callose est totalement hydrolysée pour la levée de l'endodormance ou s'il restait encore de la callose au niveau des plasmodesmes lors de l'écodormance.



**Figure 14 :** Représentation graphique de la fluorescence relative de calcéine. En A c'est la fluorescence relative de calcéine uniquement dans la partie supérieure du méristème 200 pixels. En B c'est la fluorescence relative de calcéine dans tout le méristème. Les bourgeons utilisés proviennent des prélèvements en vergers de janvier 2018 à février 2018 en A et de novembre 2018 à février 2018 en B. La base du bourgeon est plongée dans un tube à essais remplis à son fond d'une solution de calcéine (0,1%) et restera à l'obscurité pendant 24h. Les photos sont prises ensuite au microscope MVX10 (Olympus® macro zoom fluorescence) en divisant le bourgeon de façon longitudinales en deux parties égales. La face coupée en direction du microscope. Le grossissement utilisé est 0,05 x 1. Le taux de fluorescence est obtenu en quantifiant le mouvement de fluorescence de la base du bourgeon au méristème avec le logiciel ImageJ. En orange c'est le taux de fluorescence pour le pommier Golden Delicious, en Violet, c'est le taux de fluorescence pour le pommier Pink Lady et en Vert c'est le taux de fluorescence pour le pommier Reinette.



**Figure 15 :** Proposition d'un modèle de mécanisme de la dormance du pommier. Les températures froides favorisent l'induction de CBF qui va provoquer l'expression des gènes *DAM*. Les *DAM* vont inhiber l'expression des gènes *FT*. La croissance active cesse et la plante passe en endodormance. Le froid va aussi entraîner des augmentations d'expression de *GH17*. Ces *GH17* vont alors hydrolyser les dépôts de callose au niveau du plasmodesme et provoquer la levée de l'endodormance. Les flèches pleines indiquent les gènes ou condition environnementales qui induisent ou inhibent les cibles.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**Andreini L, Bartolini S, Guivarc'h A, Chriqui D, Vitagliano C (2008)** Histological and immunohistochemical studies on flower induction in the olive tree (*Olea europaea* L.). *Plant Biology* **10**: 588–595

**Aloni R., and Peterson C.A. (1997)** Auxin promotes dormancy callose removal from the phloem of *Magnolia kobus* and callose accumulation and early wood vessel differentiation in *Quercus robur*. *J. Plant Res.* **110**: 37–44.

**Andrés F, Coupland G (2012)** The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nature Reviews Genetics* **13**: 627–639.

**Bielenberg DG, Wang Y, Fan S, Reighard GL, Scorza R, Abbott AG (2004)** A deletion affecting several gene candidates is present in the evergrowing peach mutant. *Journal of Heredity* **95**: 436–444.

**Bielenberg DG, Wang Y, Li Z, Zhebentyayeva T, Fan S, Reighard GL, Scorza R, Abbott AG (2008)** Sequencing and annotation of the evergrowing locus in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] reveals a cluster of six MADS-box transcription factors as candidate genes for regulation of terminal bud formation. *Tree Genetics & Genomes* **4**: 495–507.

**Bitonti MB, Cozza R, Chiappetta A, Giannino D, Ruffini Castiglione M, Dewitte W, Mariotti D, Van Onckelen H, Innocenti AM (2002)** Distinct nuclear organization, DNA methylation pattern and cytokinin distribution mark juvenile, juvenile-like and adult vegetative apical meristems in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Journal of experimental botany* **53**: 1047–1054.

**Brunel N, Leduc N, Poupard P, Simoneau P, Mauget J-C, Viémont J-D (2002)** KNAP2, a class I KN1-like gene is a negative marker of bud growth potential in apple trees (*Malus domestica* [L.] Borkh.). *Journal of experimental botany* **53**: 2143–2149

**Bubán T, Faust M (1995)** New aspects of bud dormancy in apple trees. *Acta Horticulturae* **395**: 105–112.

**Chen XY and Kim JY (2009)** Callose synthesis in higher plants. *Plant Signaling & Behavior* **4**: 489–492.

**Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK (2007)** Cold stress regulation of gene expression in plants. *TRENDS in Plant Science* **12**: 10

**Dirlewanger E, Graziano E, Joobeur T, Garriga-Calderé F, Cosson P, Howad W, Arús P (2004)** Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae fruit crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 9891–9896.

**Fujiwara S, Oda A, Yoshida R, Niinuma K, Miyata K, Tomozoe Y, Tajima T, Nakagawa M, Hayashi K, Coupland G, Mizoguchi T (2008)** Circadian Clock Proteins LHY and CCA1 Regulate SVP Protein Accumulation to Control Flowering in Arabidopsis. *The Plant Cell* **20**: 2960–2971.

**Gleizer B, Legave JM, Berthoumieu JF, Mathieu V (2007)** Les arboriculteurs face aux changements climatiques—évolution de la phénologie florale et du risque de gel printanier. *Infos Ctifl* **235**:37–40.

**Horvath DP, Anderson JV, Chao WS, Foley ME (2003)** Knowing when to grow : signals regulating bud dormancy. *Trends in Plant Science* **8**: 534–540.

**Horvath, D. P., S. Sung, D. Kim, W. Chao and J. Anderson. (2010)** Characterization, expression and function of DORMANCY ASSOCIATED MADS-BOX genes from leafy spurge. *Plant Mol. Biol.* **73**: 169–179

**Hsu CY, Adams H, Kim K, No C, Ma SH, Strauss J, Drnevich L, Vandervelde JD, Ellis BM, Rice N, Wickett LE, gunter GA, Tuskan AM, Brunner GP, Page A, Barakat JE, Carlson CW, dePamphilis DS, Luthe C, Yuceer (2011)** FLOWERING LOCUS T duplication coordinates reproductive and vegetative growth in perennial poplar. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**: 10756–10761.

**IPCC, (2014)**, Climate Change 2014 : Synthesis Report. Contribution of working Groups I, II, III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. IPCC, Geneva, Switzerland, 151 pp.

**Jiménez S, Reighard GL, Bielenberg DG (2010)** Gene expression of DAM5 and DAM6 is suppressed by chilling temperatures and inversely correlated with bud break rate. *Plant Molecular Biology* **73**:157–167.

**Juniper BE & Mabberley DJ (2006)** The Story of the Apple. Timber Press, Portland, Oregon, USA.

**Kotoda N, Hayashi H, Suzuki M, Igarashi M, Hatsuyama Y, Kidou SI, Igasaki T, Nishiguchi M, Yano K, Shimizu T, Takahashi S, Iwanami H, Moriya S, Abe k (2010)** Molecular Characterization of FLOWERING LOCUS T -Like Genes of Apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Plant Cell Physiol* **51**: 561–575

**Lang GA, Early JD, Martin GC, Darnell RL (1987)** Endo, para, and ecodormancy : physiological terminology and classification for dormancy research. *HortScience* **22**:371–377.

**Lee JY, Hua Lu H (2011)** Plasmodesmata : the battleground against intruders. *Trends in Plant Science* **16**: 4

**Legave JM, Guédon Y, Malagi G, El Yaacoubi A, Bonhomme M (2015)** Differentiated Responses of Apple Tree Floral Phenology to Global Warming in Contrasting Climatic Regions. *Frontiers in Plant Science* **6**: 1054

**Leida C, Conesa A, Llácer G, Badenes ML, Ríos G (2012)** Histone modifications and expression of DAM6 gene in peach are modulated during bud dormancy release in a cultivar-dependent manner. *New phytologist* **193**: 67–80.

**Leseberg CH, Li A, Kang H, Duvall M, Mao L (2006)** Genome-wide analysis of the MADS-box gene family in *Populus trichocarpa*. *Gene* **378**: 84–94.

**Levy A., Erlanger M., Rosenthal M, Epel B.L (2007)** A plasmodesmata-associated b-1,3-glucanase in Arabidopsis. *Plant J.* **49**: 669–682.

**Li D, Liu C, Shen L, Wu Y, Chen H, Robertson M, Helliwell CA, Ito T, Meyerowitz E, Yu H (2008)** A Repressor Complex Governs the Integration of Flowering Signals in Arabidopsis. *Developmental Cell* **15**: 110-120.

**Li Z, Reighard GL, Abbott AG, Bielenberg G (2009)** Dormancy-associated MADS genes from the EVG locus of peach (*Prunus persica* [L.] Batsch) have distinct seasonal and photoperiodic expression patterns. *Journal of Experimental Botany* **60**: 3521–3530.

**Malagi G, Sachet RM, Citadin I, Herter FG, Bonhomme M, Regnard JL, Legave JM (2015)** The comparison of dormancy dynamics in apple trees grown under temperate and mild winter climates imposes a renewal of classical approaches. *Trees* **29**:1365–1380.

**Menzel A, Fabian P (1999)** Growing season extended in Europe. *Nature* **397**: 659.

**Michaels SD and Amasino RM (1999)** FLOWERING LOCUS C Encodes a Novel MADS Domain Protein That Acts as a Repressor of Flowering. *Plant Cell* **11**: 949–956.

**Mimida N, Saito T, Moriguchi T, Suzuki A, Komori S, Wada M (2015)** Expression of *DORMANCY-ASSOCIATED MADS-BOX (DAM)*-like genes in apple. *Biologia Plantarum* **59**: 237-244.

**Niu Q, Li J, Cai D, Qian M, Jia H, Bai S, Hussain S, Liu G, Teng Y, Zheng X (2016)** Dormancy-associated MADS-box genes and microRNAs jointly control dormancy transition in pear (*Pyrus pyrifolia* white pear group) flower bud. *Journal of Experimental Botany*, **67**: 239–257

**Olsen EJ (2003)** Molecular and Physiological Mechanisms of Bud Dormancy Régulation. *Acta horticulturae* **618**: 437-453.

**Paul LK, Rinne LH, van der Schoot C (2014)** Shoot meristems of deciduous woody perennials : self-organization and morphogenetic transitions. *Current Opinion in Plant Biology* **17**: 86–95

**Porto DD, Falavigna V da S, Arenhart RA, Perini P, Buffon V, Anzanello R, dos Santos HP, Fialho FB, de Oliveira PRD, Revers LF (2016)** Structural genomics and transcriptional characterization of the Dormancy-Associated MADS-box genes during bud dormancy progression in apple. *Tree Genetics & Genomes* **12**: 46.

**Rohde A, Bhalerao RP (2007)** Plant dormancy in the perennial context. *Trends Plant Science* **12**: 217–223.

**Rinne PLH and Van der Schoot C (2003)** Plasmodesmata at the crossroads between development, dormancy, and defense, *Can.J.Bot.*, **81**: 1182-1197

**Rinne P, Kaikuranta P, 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.

**Rinne PL, Welling A, Vahala J, Ripel L, Ruonala R, Kangasjarvi J, van der Schoot C (2011)** Chilling of dormant buds hyperinduces FLOWERING LOCUS T and recruits GA-inducible 1,3- $\beta$ -glucanases to reopen signal conduits and release dormancy in *Populus*. *Plant Cell* **23**: 130–146.

**Sasaki R, Yamane H, Ooka T, Jotatsu H, Kitamura Y, Akagi T, Tao R (2011)** Functional and expressional analyses of *PmDAM* genes associated with endodormancy in Japanese apricot (*Prunus mume*). *Plant Physiol.* **157**: 485-497.

**Sheldon CC, Burn JE, Perez PP, Metzger J, Edwards JA, Peacock WJ, Dennis ES (1999)** The FLF MADS Box Gene : A Repressor of Flowering in Arabidopsis Regulated by Vernalization and Methylation. *Plant Cell* **11**: 445–458.

**Shim D, Ko JH, Kim WC, Wang Q, Keathley DE, and Han KH (2014)** A molecular framework for seasonal growth-dormancy regulation in perennial plants. *Horticulture Research* **59**

**Simpson C, Thomas C, Findlay K, Bayer E, Maule A.J (2009)** An Arabidopsis GPI-anchor plasmodesmal neck protein with callose binding activity and potential to regulate cell-to-cell trafficking. *Plant Cell* **21**: 581–594.

**Sung SK, Yu GH, Nam J, Jeong DH, An G (2000)** Developmentally regulated expression of two MADS-box genes, MdMADS3 and MdMADS4, in the morphogenesis of flower buds and fruits in apple. *Planta* **210**: 519–528.

**Tabuenca M (1964)** Necesidades de frio invernal de variedades dealbaricoquero, melocotonero y peral. *An Aula Dei* **7**: 113–132.

**Tang J, Körner C, Muraoka H, Piao S, Shen M, Thackeray SJ, Yang X (2016)** Emerging opportunities and challenges in phenology : a review. *Ecosphere* **7**: 1–17.

**Tränkner C, Lehmann S, Hoenicka H, Hanke M-V, Fladung M, Lenhardt D, Dunemann F, Gau A, Schlangen K, Malnoy M, Flachowsky H (2010)** Over-expression of an *FT* homologous gene of apple induces early flowering in annual and perennial plants. *Planta* **232**: 1309–1324.

**Ubi BE, Sakamoto D, Ban Y, Shimada T, Ito A, Nakajima I, Takemura Y, Tamura F, Saito T, Moriguchi T (2010)** Molecular cloning of dormancy-associated MADS-box gene homologs and their characterization during seasonal endodormancy transitional phases of Japanese pear. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **135**: 174–182.

**Wang Y, Georgi LL, Reighard GL, Scorza R, Abbott AG (2002)** Genetic mapping of the evergrowing gene in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Genetics* **93**: 352-358.

**Westwood MN (1993)** Temperate-zone pomology : physiology and culture. 3rd ed. Timber Press. Portland, ore.

**Wu R, Tomes S, Karunairetnam S, Tustin SD, Hellens RP, Allan AC, Macknight RC, Varkonyi-Gasic V (2017)** SVP-like MADS Box Genes Control Dormancy and Budbreak in Apple. *Frontiers in Plant Science* **8**: 477.

**Yamane (2014)** Regulation of Bud Dormancy and Bud Break in Japanese Apricot (*Prunus mume* Siebold & Zucc.) and Peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] : A Summary of Recent Studies. *The Japanese Society for Horticultural Science* **83**: 187–202

**Youngjae P, Sungrye P, Yanpeng X, Sibum S (2014)** Regulation of Flowering by Vernalisation in *Arabidopsis*. *Advances in Botanical Research* **72**: 29-61.

# ANNEXES

**Tableau 3 : Nombre de bourgeons prélevés au verger dans le cadre de notre étude en fonction de chaque activité**

| Dates de Prélèvements<br>Au vergers | Nombre de bourgeons prélevés par génotype |           |           |                     |           |           | Nombre de bourgeons par génotype pour la RT-qPCR |          |          | Nombre de rameaux pour l'étude du flux de solutés |    |    |
|-------------------------------------|---|-----------|-----------|---------------------|-----------|-----------|--|----------|----------|---|----|----|
|                                     | Histologie                                |           |           | Hybridation in situ |           |           | GD   | PL       | Rn       | GD  | PL | Rn |
|                                     | GD  | PL        | Rn        | GD                  | PL        | Rn        | GD   | PL       | Rn       | GD  | PL | Rn |
| <b>23/10/17</b>                     | <b>15</b>                                 | <b>15</b> | <b>15</b> | <b>15</b>           | <b>15</b> | <b>15</b> | <b>3</b>   | <b>3</b> | <b>3</b> | 15  | 15 | 15 |
| <b>20/11/17</b>                     | 15  | 15        | 15        | 15                  | 15        | 15        | 3  | 3        | 3        | 15  | 15 | 15 |
| <b>05/12/17</b>                     | 15  | 15        | 15        | 15                  | 15        | 15        | 3  | 3        | 3        | 15  | 15 | 15 |
| <b>19/12/17</b>                     | 15  | 15        | 15        | 15                  | 15        | 15        | 3  | 3        | 3        | 15  | 15 | 15 |
| <b>09/01/18</b>                     | 15  | 15        | 15        | 15                  | 15        | 15        | 3  | 3        | 3        | 15  | 15 | 15 |
| <b>22/01/18</b>                     | 15  | 15        | 15        | 15                  | 15        | 15        | 3  | 3        | 3        | 15  | 15 | 15 |
| <b>29/01/18</b>                     | 15  | 15        | 15        | 15                  | 15        | 15        | 3  | 3        | 3        | 15  | 15 | 15 |
| <b>05/02/18</b>                     | 15  | 15        | 15        | 15                  | 15        | 15        | 3  | 3        | 3        | 15  | 15 | 15 |
| <b>13/02/18</b>                     | 15  | 15        | 15        | 15                  | 15        | 15        | 3  | 3        | 3        | 15  | 15 | 15 |
|                                     | 405 bourgeons                             |           |           | 405 bourgeons       |           |           | 81 bourgeons                                     |          |          | 405 bourgeons                                     |    |    |
| <b>Total</b>                        | <b>1296 bourgeons</b>                     |           |           |                     |           |           |  |          |          |   |    |    |

**Tableau 4 : Paramètres de coupes transversales et longitudinales au vibratome**

| Paramètres                        | Valeurs  |
|-----------------------------------|----------|
| Fréquence de vibration de la lame | 50 Hz    |
| Amplitude de vibration de la lame | 0.8 mm   |
| Vitesse de coupe                  | 35 mms-1 |
| Epaisseur de coupe                | 60 µm    |

**Tableau 5 : Réactifs pour la fabrication du Bleu d'aniline**

| Réactifs   | Quantités  |
|--|--|
| Tampon de potassium phosphate dibasique (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> M/15) | 200 ml (2.32g de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> dans 200ml d'eau distillée) |
| Tampon de potassium phosphate tribasique (K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> M/15) | 50 ml (0.71g de K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> dans 50ml d'eau distillée)    |
| Bleu aniline water soluble   | 20 mg  |

**Tableau 6 : Lavage Post-Hybridation**

|   |      |                  |            |
|---|------|------------------|------------|
| 2 SSC   | RT   | cuve             | 1 x 5 min  |
| 2 SSC   | 50°C | module de lavage | 1 x 45 min |
| NTE 1X  | RT   | cuve             | 1 x 5 min  |
| NTE 1X  | 37°C | cuve             | 1 x 5 min  |
| Ajouter la RNase A pour une concentration finale de 20 µg/ml NTE 1X |      |                  |            |
| Solution de RNase A   | 37°C | 1ml/lame         | 1 x 30 min |
| NTE 1X  | 37°C | cuve             | 2 x 5 min  |
| 1 SSC   | 55°C | module de lavage | 2 x 30 min |

## **Protocole d'extraction des ARN kit sigma**

- 1- Préparer la solution de Lyse (1ml de la solution de lyse pour 10 $\mu$ l de 2-mercaptoethanol)
- 2- Insérer colonne de filtration dans des tubes collection de 2ml
- 3- Pipetter 500 $\mu$ l de la solution de Lyse dans 100mg du tissu en poudre. Vortex pendant 30 secondes et incuber pendant 5mn à 56°C
- 4- Centrifuger pendant 3mn
- 5- Récupérer le surnageant dans les tubes de collection de 2ml équipé de colonne de filtration
- 6- Centrifuger pendant 1mn. Jeter les colonnes de filtration et ajouter 500 $\mu$ l de la solution binding et mixer à l'aide de votre pipette
- 7- Récupérer ensuite 700 $\mu$ l du mixte que vous mettez dans un tube collection de 2ml équipé de binding colonne
- 8- Centrifuger pendant 1mn. Jeter le fond du tube et une nouvelle centrifugation pendant 1mn
- 9- Ajouter 500 $\mu$ l de la solution Wash 1 et centrifuger pendant 1mn puis jeter le fond du tube
- 10- Ajouter 500 $\mu$ l de la solution Wash 2 et centrifugation pendant 30 secondes
- 11- Ajouter encore 500 $\mu$ l de la solution Wash 2 et centrifugation pendant 30secondes
- 12- Centrifuger la colonne uniquement pendant 1mn
- 13- Transférer la colonne dans un nouveau tube et ajouter 37 $\mu$ L de la solution d'éluion. Centrifuger pendant 1mn pour récupérer les ARN totaux.

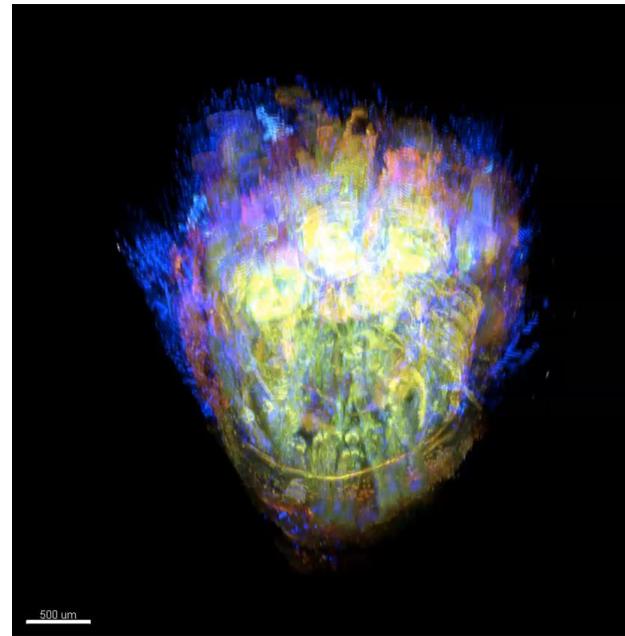
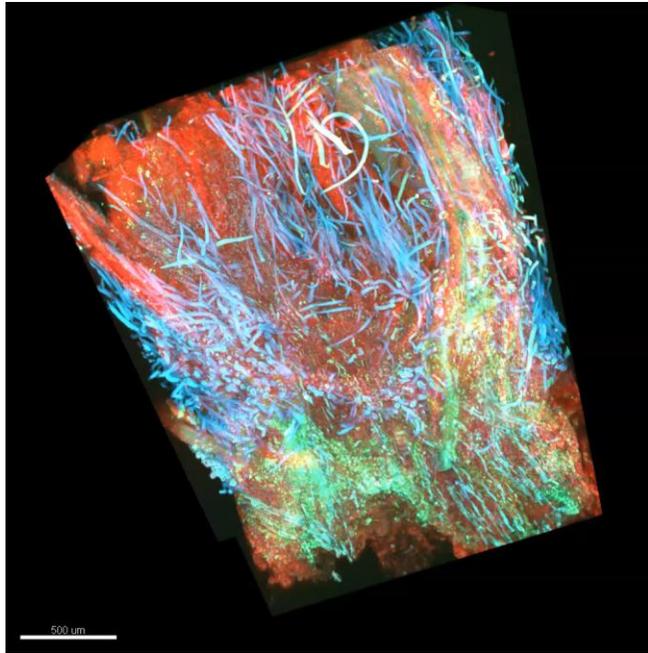
## **Inclusion paraffine**

Penser à mettre en route l'étuve à paraffine (58°C) la veille (labo 37).

Faire fondre dans l'étuve suffisamment de paraffine (Paraplast) dans un bécher stérile

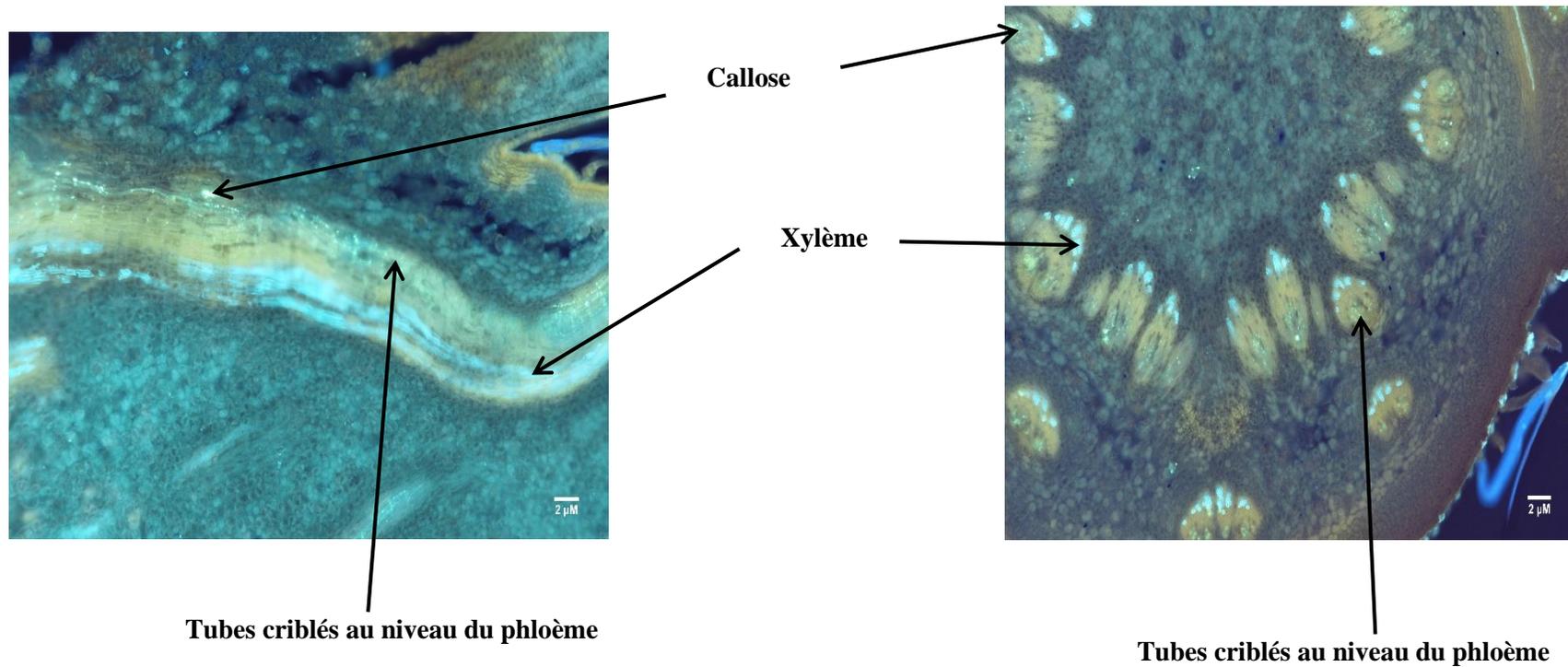
| <b>Composition</b> | <b>du mélange</b> | <b>Nombre de bains</b> | <b>Durée</b>   |
|--------------------|-------------------|------------------------|----------------|
| Butanol 2          | Safesolv 1        | 1                      | 1 h            |
| Butanol 1          | Safesolv 2        | 1                      | 1 h            |
| 0                  | Safesolv 1        | 2                      | 1 h            |
| Safesolv 3         | Paraplast 1       | 1                      | 1 h            |
| Safesolv 1         | Paraplast 1       | 1                      | 2 h            |
| Safesolv 1         | Paraplast 3       | 1                      | 2 h            |
| Paraplast pur      |                   | 1                      | 2h minimum     |
| Paraplast pur      |                   | 1                      | 1 nuit minimum |

Les bains de Safesolv/Paraplast et Paraplast pur sont faits dans l'étuve à 58°C. Le lendemain matin, changer encore le bain de Paraplast. Mettre des pastilles de Paraplast dans le pot chauffant avec bec verseur et l'allumer (58 °C). Allumer aussi la plaque chauffante, mettre un papier aluminium pour la protéger des gouttes de paraffine. Préparer les moules d'inclusion et des petites étiquettes en papier pour identifier les échantillons. La lampe à alcool servira à chauffer les pinces. Remplir complètement un moule sur la plaque chauffante, déposer l'échantillon au fond et l'orienter avec les pinces (pour obtenir des coupes transversales ou longitudinales). Recommandation : bien remplir les moules avec la paraffine et éviter la formation de bulles lors de l'inclusion. Mettre le moule dans un récipient contenant un peu d'eau froide pour accélérer la polymérisation, plonger l'extrémité de l'étiquette dans la paraffine. Les blocs seront conservés à -20°C dans une boîte bien identifiée.



**Figure 16** : Reconstruction en 3D du bourgeons dormants de pommier Golden Delicious

A gauche c'est la reconstruction 3D longitudinalement. A droite c'est la reconstruction en 3D transversalement. La couleur rouge de certains tissus de la reconstruction longitudinale correspond à priori à des polyphénols, la couleur bleue correspond à priori à la présence des poils et c'est aussi la couleur du xylème. La verte correspond à priori à des dépôts de callose. Les images sont reconstituées avec le logiciel Imarix. La barre d'échelle est de 500µm.



**Figure 17** : Coupe histologique de bourgeons de pommier colorés au bleu d'aniline. A gauche se trouve une coupe longitudinale et à droite se trouve une coupe transversale. L'épaisseur de coupe est de 60μm au microscope à épifluorescence au grossissement x10. La barre d'échelle est de 2μM.