HAL
open science

Etude du photocontrôle du débourrement du bourgeon chez le rosier (Rosa sp. L) : impact de la lumière sur le métabolisme glucidique et l'élongation cellulaire

Tiffanie Girault

To cite this version:

Tiffanie Girault. Etude du photocontrôle du débourrement du bourgeon chez le rosier (Rosa sp. L) : impact de la lumière sur le métabolisme glucidique et l'élongation cellulaire. Agronomie. Université d'Angers, 2009. Français. NNT : . tel-00960749

HAL Id: tel-00960749

https://theses.hal.science/tel-00960749v1

Submitted on 18 Mar 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE D'ANGERS

Année 2009
N° d'ordre : 946

ETUDE DU PHOTOCONTROLE DU DEBOURREMENT DU BOURGEON CHEZ LE ROSIER (*Rosa sp.* L.) : IMPACT DE LA LUMIERE SUR LE METABOLISME GLUCIDIQUE ET L'ELONGATION CELLULAIRE

THESE DE DOCTORAT
Spécialité : Sciences Agronomiques

ECOLE DOCTORALE VENAM

Présentée et soutenue publiquement
le 23 juin 2009 à l'Université d'Angers par :

Tiffanie GIRAULT

Devant le jury ci-dessous :

Mme Rossitza ATANASSOVA (rapporteur), Professeur, Université de Poitiers
Mme Catherine RAMEAU (rapporteur), Directrice de Recherche, INRA de Versailles
Mme Hélène GAUTIER (examinateur), Chargée de Recherche, INRA d'Avignon
M. David MACHEREL (examinateur), Professeur, Université d'Angers
Mme Nathalie LEDUC (examinateur), Maître de Conférences, Université d'Angers

Directrice de thèse : Mme Nathalie LEDUC, Maître de Conférences, Université d'Angers

Laboratoire de Morphogenèse des Ligneux, UMR SAGAH A-462, UFR Sciences, 2 Bd Lavoisier
49045 Angers cedex 01

ED495

RESUME

La qualité esthétique d'une plante ornementale est conditionnée par de nombreux critères, et notamment la forme globale de la plante. Celle-ci est le résultat du fonctionnement des bourgeons le long des tiges et de la croissance des rameaux produits. Chez un certain nombre de végétaux, les facteurs environnementaux ont un impact fort sur la construction architecturale de la plante, qui génère cette forme. Ainsi, parmi ces facteurs, la lumière tant en quantité que qualité, peut moduler la capacité des bourgeons à débourrer. Au delà de cette constatation rapportée chez plusieurs espèces, très peu de travaux ont cherché à identifier les mécanismes par lesquels la lumière régule le processus de débourrement. Pour aborder cette question, nous avons lancé des recherches chez plusieurs variétés de rosier-buisson (*Rosa sp.* L.), en couplant des approches morphologiques, histologiques, biochimiques et moléculaires. Les études ont été menées sur des plantes expérimentales, défeuillées et décapitées au-dessus des trois bourgeons basaux de la tige principale, afin de limiter l'impact des inhibitions corrélatives entre organes, pouvant masquer ou interagir avec les mécanismes du photocontrôle.

Nos résultats démontrent un besoin absolu de lumière pour le débourrement chez le rosier. En effet, aucun débourrement n'est observé à l'obscurité chez les six variétés de rosiers étudiées, ce qui n'est pas le cas chez les espèces modèles telles qu'*Arabidopsis thaliana*, la tomate ou le peuplier. Des expériences de masquage ont permis de montrer que le bourgeon percevait directement le signal lumineux requis pour le débourrement, soulignant ainsi une signalisation courte entre les organes récepteurs (écailles) et les sites de croissance (méristème apical, jeunes feuilles préformées). La lumière, aussi bien en termes d'intensité que de qualité, module le débourrement des bourgeons. Ainsi, de faibles intensités lumineuses (2 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) sont suffisantes pour permettre la croissance des jeunes feuilles préformées mais pas l'activité organogénique du méristème apical caulinaire. De même, les raies spectrales bleue et rouge clair permettent, contrairement à la lumière rouge sombre, l'induction de ces deux processus.

On peut alors s'interroger sur le photocontrôle des processus physiologiques-clés du débourrement. Deux de ces processus ont fait l'objet d'une étude plus approfondie : le métabolisme glucidique et l'expansion cellulaire. Nos travaux montrent que le débourrement obtenu à la lumière est associé à un afflux d'eau et de sucres dans le bourgeon, ainsi qu'à une métabolisation du saccharose en sucres simples : glucose et fructose. La lumière agit en favorisant la transcription de gènes et/ou les activités d'enzymes de dégradation du saccharose que sont l'invertase acide vacuolaire et la saccharose synthase. L'élongation cellulaire est aussi stimulée à la lumière comme le montrent nos mesures en microscopie électronique à balayage. A l'obscurité, ces processus sont réduits ou inhibés n'offrant ainsi pas les conditions de croissance nécessaires au débourrement. L'expression génique d'une expansine, protéine intervenant dans le relâchement de la paroi au cours de l'élongation cellulaire, est ainsi fortement réprimée. En réponse au stress provoqué par l'obscurité permanente, la stimulation de la transcription d'une sorbitol déshydrogénase pourrait prendre le relais du métabolisme glucidique pour contribuer à la survie cellulaire.

Nos travaux démontrent ainsi que le photocontrôle du débourrement du bourgeon s'exerce au travers d'au moins deux processus physiologiques: le métabolisme glucidique et l'élongation cellulaire. Au regard de nos résultats et de ceux de la bibliographie, nous proposons un modèle du contrôle par la lumière du débourrement.

Mots-clés : *Rosa sp.* L., bourgeon, débourrement, lumière, photocontrôle, métabolisme glucidique, invertase acide vacuolaire, saccharose synthase, élongation cellulaire, expansine.

ABSTRACT

The aesthetic quality of ornamental plants is affected by several criterions, including the global shape of the plant. It is the result of buds activity along stems and of the growth of the shoot produced. In many plants, environmental factors have a strong impact on plant architecture, which generates this form. Among these factors, light, both in intensity or in quality, may modulate the ability of bud to burst. Apart from this observation made in several species, only few studies have tried to identify the mechanisms involved in the light control of this process. To address this issue, we have started works on many rose bush varieties. These works are based on morphological, histological, biochemical and molecular studies. Our studies were carried out on experimental plants, defoliated and decapitated over the three basal buds of the main stem. Working on such plant model allows to limit the impact of correlative inhibitions between organs, which may block or interact with the mechanisms of photocontrol.

Our results demonstrate that light is absolutely required to trigger bud burst in rose. Indeed, no bud burst occurred under darkness among the six varieties studied, which is not the case in most species like *Arabidopsis thaliana*, tomato or poplar. Shading experiments have shown that bud directly perceives the light signal necessary for burst, thus indicating that a short-distance signalling takes place between the receptive organ (bud scales) and the growing organs (shoot apical meristem, young leaves). Light, both in terms of intensity and quality, modulates bud burst. Thus, low light intensities (2 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) are sufficient to allow the growth of preformed leaves but not to trigger the shoot apical meristem organogenic activity. Blue and red lights, unlike far-red light, induce both these processes.

A question comes up then: what are the key physiological processes involved in bud burst that are under light control ? Two physiological processes have been particularly studied : sugar metabolism and cell wall expansion. Our results show that, under light, bud bursting is associated with an influx of water and sugars in the bud, and with sucrose degradation into fructose and glucose. Light acts by promoting the transcription of genes and/or the activities of sucrose degradation enzymes such as vacuolar acid invertase and sucrose synthase. Cell elongation is also stimulated in light conditions as shown by our scanning electron microscopy experiment. Under darkness, these processes are reduced or inhibited and do not offer the optimal conditions necessary to bud burst. Thus, gene expression of an expansin, a protein involved in cell wall loosening during cell elongation, is highly reduced. In response to the stress caused by a long dark period, an increased transcription of a sorbitol dehydrogenase gene takes place, that could take over from sugar metabolism for cell survival.

Thus, our study demonstrates that the photocontrol of bud burst occurs through at least two physiological processes : sugar metabolism and cell elongation. Given our results and those of the literature, we propose a model of control of bud burst by light.

Key words : *Rosa sp.* L., bud, bursting, light, photocontrol, sugar metabolism, vacuolar acid invertase, sucrose synthase, cell elongation, expansin.

UNIVERSITE D'ANGERS

Année 2009
N° d'ordre : 946

ETUDE DU PHOTOCONTROLE DU DEBOURREMENT DU BOURGEON CHEZ LE ROSIER (*Rosa sp.* L.) : IMPACT DE LA LUMIERE SUR LE METABOLISME GLUCIDIQUE ET L'ELONGATION CELLULAIRE

THESE DE DOCTORAT
Spécialité : Sciences Agronomiques

ECOLE DOCTORALE VENAM

Présentée et soutenue publiquement
le 23 juin 2009 à l'Université d'Angers par :

Tiffanie GIRAULT

Devant le jury ci-dessous :

Mme Rossitza ATANASSOVA (rapporteur), Professeur, Université de Poitiers
Mme Catherine RAMEAU (rapporteur), Directrice de Recherche, INRA de Versailles
Mme Hélène GAUTIER (examinateur), Chargée de Recherche, INRA d'Avignon
M. David MACHEREL (examinateur), Professeur, Université d'Angers
Mme Nathalie LEDUC (examinateur), Maître de Conférences, Université d'Angers

Directrice de thèse : Mme Nathalie LEDUC, Maître de Conférences, Université d'Angers

Laboratoire de Morphogenèse des Ligneux, UMR SAGAH A-462, UFR Sciences, 2 Bd Lavoisier
49045 Angers cedex 01

ED495

Remerciements

Et voilà, après plus de 15000 rosiers guillotinés, c'est la fin de l'histoire et il est temps de dresser le bilan. Pour que la page se tourne dans la joie et que la route continue belle et ensoleillée pour tout le monde, j'adresse mes remerciements chaleureux et enthousiastes aux personnes qui vont suivre.

Je souhaiterais tout d'abord exprimer mes remerciements à Madame Nathalie Leduc, Maître de conférences à l'Université d'Angers et directrice de thèse. Je ne saurais comment la remercier justement tant je lui dois : toujours disponible, elle a su m'aider et me soutenir tout au long de ces années.

Je tiens également à remercier Monsieur Jean-Daniel Viémont, Professeur à l'Université d'Angers, mon premier directeur de thèse, pour son accueil au sein du « Laboratoire de Morphogenèse des Ligneux ».

Mes remerciements s'adressent à Madame Rossitza Atanassova, Professeur à l'Université de Poitiers, d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être rapporteur.

Je tiens à remercier Madame Catherine Rameau, Directrice de Recherche à l'INRA de Versailles, d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être rapporteur.

Enfin, je tiens également à remercier Madame Hélène Gautier, Chargée de Recherche à l'INRA d'Avignon, et Monsieur David Macherel, Professeur à l'Université d'Angers, pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse et d'être examinateurs de ce travail.

Je voudrais aussi montrer ma reconnaissance à Madame Annick Dubois, Monsieur Fabrice Foucher, Monsieur Manuel Le Bris et Monsieur Didier Combes, pour avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse et pour m'avoir aiguillée au cours de ces années.

Je souhaite remercier Monsieur Jean-Louis Julien pour son accueil au sein de l'UMR PIAF et Monsieur Soulaïman Sakr pour avoir fait en sorte que l'expérience AFLP puisse se faire. Merci à Jean-Stéphane Venisse et Stéphane Herbette pour leur aide et leurs conseils, et à Khaoula Ben Baaziz pour sa grande aide et sa présence (soirs et week-ends !).

Tout ce travail n'aurait pas été possible sans les nombreuses plantes cultivées par Michel Laffaire et son équipe de choc : Séverine Chalain, Anita Lebrec, Bénédicte Dubuc et anciennement Michel Poirier. Merci pour votre aide et votre travail.

Je remercie tout particulièrement Monique Sigogne pour avoir broyé avec moi pendant plusieurs semaines les échantillons destinés aux dosages des sucres et pour avoir participé au défrichage « AFLP ». Puisqu'on parle d'AFLP, j'adresse un bonjour tout particulier à ce cher *Pampus argenteus* qui, lui, ne m'a pas aidé du tout !

Mes profonds remerciements s'adressent également à Sandrine Pelleschi-Travier pour son aide concernant les dosages de sucres ainsi que pour sa gentillesse tout au long de l'aventure.

Je ne pourrais pas ne pas remercier Véronique Bergougnoux, toujours présente même après son départ pour Olomouc. Merci pour ton aide, tes conseils et ton amitié.

Je souhaite remercier Mickaël Delaire pour sa bonne humeur et surtout pour son aide lors de la préparation de mes premiers TP !

Merci à José Gentilhomme pour ses conseils, ses discussions et sa bonne humeur (courage Davina ! Tu peux le faire !).

Une pensée toute particulière aux thésardes qui sont embarquées dans la même "aventure" et avec qui j'ai partagé de sympathiques moments : Clémence Henry et Amélie 'Heidi' Rabot. Que la force soit avec vous pour la suite ! ;)

Je remercie également tous les membres de l'UMR SAGAH pour leur accueil.

J'adresse des remerciements aux amies de longue date : Véronique Vallé, Céline Berthouin et Gwenola Venault. A cela s'ajoute une mention spéciale pour les personnes suivantes : Laureen (la puce), Laura (lolinette), Sandrine (le clown), Charlotte (la folle), les filles du basket de Beaucouzé, les 'Teddy Bears On Fire' et les 'Feugibou' (de Guitar Hero !), Muse, Paramore, Blue October et Kings of Leon (mes compagnons nocturnes).

Je continuerai par une pensée toute particulière à ma famille pour leur soutien au cours de ces années. Merci à mes frères et sœurs : Lorène, Bruno et Nathalie (respectivement CS, FP et BS). Merci à Ophélie (que j'aime, que j'adore de tout mon cœur jusqu'à l'infini) pour son appel téléphonique du jeudi soir et pour avoir gardé le lion Albus pendant mes absences. Je voudrais finalement remercier mes parents à qui je dois tant : merci pour votre soutien, vos encouragements et votre présence.

Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique (= DNA)
ADNc	ADN complémentaire (= cDNA)
ADP	Adénosine di-phosphate
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism (*Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés*)
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
ARNtx	ARN totaux
ATP	Adénosine tri-phosphate
BET	Bromure d'éthidium
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (*Outil de recherche d'alignements locaux*)
BSA	Bovine Serum Albumine (*Albumine de serum bovin*)
Ct	Treshold cycle (*cycle-seuil*)
DEPC	Diéthyl pyrocarbonate
DMSO	Diméthyl sulfoxide
DNAse	Acide désoxyribonucléase
dNTP	Désoxynucléotide 5'-triphosphate
DO	Densité optique
DTT	Dithiothréitol
Eau milliQ	Eau ultrapure
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
ESTs	Expressed sequence tags (*Etiquettes de séquences transcrites*)
EXP10	Expansine 10
Fru	Fructose
G6PDH	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
GAPDH	Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
Glu	Glucose
HK	Hexokinase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (*Chromatographie liquide haute performance*)
IAP	Invertase acide pariétale
IAV	Invertase acide vacuolaire
IPTG	Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside
kb	Kilo-base
LB	Milieu Luria-Bertani
mA	Milliampère
MF	Matière fraîche
µg	Microgramme
µL	Microlitre
mg	Milligramme
min	Minute
mm	Millimètre
mL	Millilitre
mM	Millimolaire

MS	Matière sèche
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé (=NAD^+)
NAD-SDH	Sorbitol déshydrogénase NAD-dépentante
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydé (=$NADP^+$)
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NTP	Nucléoside tri-phosphate
Oligo(dT)	Oligo-désoxythymidine
pb	Paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (*Réaction de polymérisation en chaîne*)
PEG	Polyéthylène glycol
PGI	Phosphoglucoisomérase
PVP 40	Polyvinylpyrrolidone
PVPP	Polyvinyl polypyrrolidone
p/v	Poids/volume
qRT-PCR	RT-PCR quantitative en temps réel
qsp	Quantité suffisante pour
Rc	Rouge clair
RNAse	Ribonucléase
rpm	Rotation par minute
Rs	Rouge sombre
RT	Reverse Transcription (*Transcription inverse*)
s	Seconde
Sac	Saccharose
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SUSY	*Sucrose synthase* (Saccharose synthase)
TAE	Tampon Tris/Acétate/EDTA
TBE	Tampon Tris/Borate/EDTA
Taq	*Thermus aquaticus*
U	Unité(s)
UV	Ultra violet
VIS	Visible
v/v	Volume/volume
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside

Lexique

Bourgeon	Entité complexe constituée d'écailles, de jeunes feuilles et de primordia foliaires recouvrant le méristème apical caulinaire, l'ensemble étant disposé sur un axe court constitué de l'empilement des entre-nœuds des feuilles préformées et des écailles.
Ecaille	Feuille modifiée recouvrant le bourgeon et ayant un rôle de protection.
Primordium foliaire	Feuille à l'état embryonnaire et dont la forme finale n'est pas encore observable.
Jeune feuille	Feuille en croissance dont la future forme est visible (dans le cas du rosier, on distingue les folioles).
Feuille préformée	Feuille présente au sein du bourgeon, avant son débourrement.
Feuille postformée	Feuille formée au sein du bourgeon, après son débourrement.

Sommaire

Introduction *1*

Synthèse bibliographique *5*

1. Le genre *Rosa* : classification, historique et importance économique 6
   - *1-1. Classification du genre Rosa* *6*
   - *1-2. Historique de la culture du genre Rosa* *6*
   - *1-3. Importance économique* *7*
2. Qualité esthétique et architecture 8
   - *2-1. Qualité esthétique* *8*
   - *2-2. Architecture végétale* *9*
   - *2-3. Apport des techniques horticoles dans la maîtrise de l'architecture de la plante* *10*
3. Le débourrement des bourgeons 12
   - *3-1. Levée de dormance* *12*
   - *3-2. Reprise de croissance* *15*
   - *3-3. Besoins en eau lors de la reprise de croissance* *23*
   - *3-4. Besoins en nutriments lors de la reprise de croissance* *23*
4. Rôle de la lumière dans la photomorphogenèse et le débourrement 31
   - *4-1. La lumière : définition et mécanismes de perception* *31*
   - *4-2. Les photorécepteurs de la photomorphogenèse et leurs voies de signalisation* *32*
   - *4-3. Effet de la lumière sur l'architecture et le débourrement* *39*
   - *4-4. Effet de la lumière sur les composantes physiologiques du débourrement* *41*

Matériels et Méthodes *45*

1. Matériel végétal 46
   - *1-1. Variétés de rosiers* *46*
   - *1-2. Jeunes plantes d'Arabidopsis thaliana, de tomate et de peuplier* *47*
2. Traitements lumineux 48
3. Etude morphologique du débourrement 49
   - *3-1. Evaluation du débourrement et de la croissance foliaire* *49*
   - *3-2. Evaluation de l'activité organogénique au sein du méristème apical* *50*
   - *3-3. Evaluation de la croissance des cellules des primordia foliaires* *50*
4. Techniques de biologie moléculaire 51
   - *4-1. Extraction d'acides nucléiques* *51*
   - *4-2. Obtention d'ADN complémentaire* *51*
   - *4-3. Techniques d'amplification d'ADN par PCR* *53*
   - *4-4. Techniques de clonage* *60*
   - *4-5. Technique de cDNA-AFLP* *62*
5. Dosage des sucres solubles et mesures d'activités enzymatiques 67
   - *5-1. Dosage des sucres solubles* *67*
   - *5-2. Dosage de l'amidon* *70*
   - *5-3. Mesure des activités enzymatiques* *70*
6. Analyses statistiques 73
   - *6-1. Etude morphologique du débourrement* *73*
   - *6-2. RT-PCR quantitative et analyses biochimiques* *73*

Résultats et Discussions *74*

Chapitre I. Etude morphologique de l'impact de la lumière sur le débourrement chez le rosier *76*

1. Etude du besoin de lumière lors du débourrement chez différentes espèces et différentes variétés de rosier 76
2. Etude de la généricité du besoin de lumière 76
3. Site impliqué dans la perception de la lumière nécessaire au débourrement 77
4. Impact de la lumière sur le débourrement et ses composantes 78
   - *4-1. Etude de l'organogenèse au sein du bourgeon axillaire au cours du débourrement en conditions permissives* *78*
   - *4-2. Effet de l'intensité lumineuse* *79*
   - *4-3. Effet de la qualité de la lumière* *81*
   - *4-4. Efficacités relatives des lumières bleue et rouge clair* *83*
5. Discussion 84
   - *5-1. Le besoin absolu de lumière pour le débourrement n'est pas une règle générale chez les plantes* *84*
   - *5-2. Les bourgeons sont les organes percepteurs de la lumière utile au débourrement* *85*
   - *5-3. L'intensité du photocontrôle du débourrement chez Rosa sp. varie avec le génotype* *86*
   - *5-4. L'afflux d'eau et la croissance des tissus au cours du débourrement sont sous contrôle lumineux* *86*
   - *5-5. Le débourrement est fonction de l'intensité lumineuse mais est permis par des intensités lumineuses faibles* *88*
   - *5-6. Les lumières rouge clair et bleue déclenchent le débourrement, contrairement à la lumière rouge sombre* *88*
   - *5-7. L'activité organogénique du méristème et la croissance des feuilles préformées sont régulées par l'intensité et la qualité lumineuses* *89*
   - *5-8. Identification du ou des photorécepteurs impliqués dans la perception de la lumière utile au débourrement* *90*

Chapitre II. Etude du photocontrôle du métabolisme glucidique du bourgeon au cours du débourrement *94*

1. Etude du métabolisme glucidique lié au sorbitol 94
   - *1-1. Dosage du sorbitol au cours du débourrement* *94*
   - *1-2. Activité de l'enzyme NAD-SDH* *94*
   - *1-3. Evolution de l'expression génique d'une NAD-SDH* *94*
2. Etude du métabolisme du saccharose 95
   - *2-1. Evolution des quantités de Saccharose, de Glucose, de Fructose et d'Amidon au cours du débourrement* *95*
   - *2-2. Mesures d'activités d'enzymes impliquées dans la dégradation du saccharose* *97*
   - *2-3. Etude de l'expression de gènes codant des enzymes du métabolisme glucidique au cours du débourrement* *98*
3. Discussion 100
   - *3-1. Rôle du métabolisme du sorbitol au cours du photocontrôle du débourrement du bourgeon de rosier* *100*
   - *3-2. Etude du photocontrôle du métabolisme glucidique au cours du débourrement chez le rosier* *103*

Chapitre III. Etude du photocontrôle de la croissance des jeunes feuilles préformées et de l'élongation cellulaire *110*

1. Etude morphologique de l'impact de la lumière sur la croissance des jeunes feuilles préformées 110
   1-1. Mesures de la croissance des jeunes feuilles *110*
   1-2. Elongation des cellules des jeunes feuilles *111*

2. Etude de l'expression d'un gène impliqué dans l'élongation cellulaire : une expansine. 111
   2-1. Clonage d'un gène d'expansine chez le rosier (RhEXP) *112*
   2-2. Expression du gène RhEXP au sein de la plante *112*
   2-3. Expression du gène RhEXP dans les bourgeons distaux soumis à différents traitement lumineux ... *113*
   2-4. Etude de la région promotrice du gène RhEXP *114*

3. Discussion 115
   3-1. L'obscurité inhibe la croissance des jeunes feuilles préformées en limitant l'élongation cellulaire *115*
   3-2. Etude de l'expression génique d'une expansine de rosier et de son photocontrôle au cours du débourrement *116*
   3-3. Le promoteur du gène RhEXP présente de nombreuses boîtes de réponse à la lumière *119*

Discussion générale ***122***

Conclusion et Perspectives ***135***

Références bibliographiques ***143***

Publication ***179***

Annexes ***180***

Introduction

Ce travail de thèse a été mené au sein de l'UMR SAGAH (Unité Mixte de Recherche Sciences AGronomiques Appliquées à l'Horticulture) A-462 INRA/Agrocampus-Ouest-centre d'Angers/Université d'Angers, et plus particulièrement au sein du laboratoire de Morphogenèse des Ligneux (UFR Sciences, Université d'Angers). Cette UMR s'organise autour de trois axes – « la caractérisation de la qualité esthétique du rosier », « la caractérisation de l'architecture du rosier-buisson » et « le déterminisme de l'élaboration de l'architecture » – dans le but de réaliser un modèle dynamique de type structure-fonction de l'élaboration de l'architecture d'un rosier-buisson en fonction de l'environnement. C'est dans le cadre du dernier axe que s'inscrit ce travail, encadré par le Dr Nathalie Leduc. Cette thèse a bénéficié du soutien financier du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

La qualité esthétique d'une plante ornementale est un critère commercial important auquel les professionnels de l'horticulture s'intéressent tout particulièrement. Plusieurs critères entrent en jeu dans la définition de cette qualité. C'est notamment le cas de la couleur et de la densité du feuillage, de la couleur des fleurs, du nombre de pétales, etc… (Boumaza *et al*., 2009). A cela s'ajoute la forme de la plante, caractérisée par l'agencement dans l'espace de ses ramifications et par leur nature (longueur, vigueur des axes…). Chez le rosier de jardin, plante ornementale appartenant au genre économiquement le plus important de l'horticulture ornementale (Gudin, 2002) et dont les ventes ne cessent d'augmenter depuis ces dix dernières années (Promojardin, 2007), les producteurs cherchent à obtenir des plantes de structure équilibrée, de port buissonnant, grimpant ou rampant. En ce qui concerne le port buissonnant, la ramification basale est essentielle pour obtenir un buisson fourni. Les jeunes plantes produites doivent ainsi porter plusieurs branches basales vigoureuses dont l'orientation dans l'espace donnera à la plante une forme évasée. Cette ramification basale n'est pas toujours facilement obtenue, et dépend du génotype de la plante, mais aussi de différentes techniques de production horticole. La taille manuelle ou mécanique des plantes est le premier outil permettant le contrôle de la ramification. A cela peut s'ajouter l'utilisation de molécules nanifiantes, qui permettent de freiner ou de supprimer l'élongation des tiges. Cependant, ces molécules vont être prochainement retirées du marché au vu de leur dangerosité pour l'environnement et pour l'Homme. La recherche de nouveaux procédés permettant la modification de l'architecture de la plante dans un cadre respectueux de l'environnement devient donc nécessaire.

Dans cet objectif, la manipulation des facteurs de l'environnement offre des perspectives prometteuses. En effet, plusieurs travaux de recherche, menés chez des plantes ornementales telles le pétunia, le rhododendron ou l'hortensia, ont mis en évidence un impact de la nutrition azotée, de l'humidité, et de la température sur le développement des plantes et leur architecture (*Rhododendron catawbiense* L., Fustec & Beaujard, 2000 ; *Petunia hybrida* L., Bachman & McMahon, 2006 ; *Hydrangea macrophylla* L., Codarin *et al*., 2006). La lumière est un autre facteur, également important dans l'élaboration de l'architecture de la plante : il a en effet été montré dans la littérature qu'elle régulait l'élongation des tiges mais aussi modulait la fréquence de débourrement des bourgeons le long d'un axe chez certaines espèces (Muleo *et al.*, 2001 ; Kawamura & Takeda, 2002, 2004 ; Niinemets & Lukjanova, 2003 ; Muleo & Morini, 2006, 2008). Afin d'approfondir l'effet de la lumière sur l'élaboration de l'architecture d'une plante et à terme proposer de nouveaux outils à la profession pour la maîtrise de la forme des végétaux, des recherches sont préalablement indispensables. En effet, il est nécessaire de déterminer la nature des bandes du spectre lumineux actifs sur l'architecture, de même que leurs intensités, et de préciser sur quels processus du développement la lumière agit, afin de mieux cibler, notamment temporellement, les traitements. Enfin, connaître les processus physiologiques photorégulés au cours du débourrement, ainsi que la chaîne de transduction du signal lumineux, apportera des informations utiles à la manipulation ou à la sélection de génotypes d'intérêt.

Dans ce travail, nous abordons une partie de cette large problématique, qui fait l'objet de très peu de recherches dans la communauté internationale. Notre travail s'est concentré sur l'impact de la lumière sur le débourrement des bourgeons, processus premier de la ramification. Après avoir rappelé les données bibliographiques qui ont permis d'orienter nos recherches, nous exposons dans trois chapitres nos résultats.

Le premier chapitre détaille, d'un point de vue morphologique, les effets d'intensités et de qualités lumineuses sur le débourrement des bourgeons et sur deux de ses composantes clés, i.e. la croissance des jeunes feuilles préformées et l'activité organogénique du méristème.

Dans les deuxième et troisième chapitres, l'impact de la lumière sur le métabolisme glucidique et sur l'expansion cellulaire, qui jouent un rôle primordial dans le débourrement, est étudié par des approches biochimiques et moléculaires.

La dernière partie fait l'objet d'une discussion générale, à l'issue de laquelle un modèle du photocontrôle du débourrement est proposé en regard de nos résultats et de ceux de la bibliographie.

Une partie des résultats présentés dans ce manuscrit est publiée et est présentée à la fin du manuscrit :

Girault T, Bergougnoux V, Combes D, Viémont J-D, Leduc N (2008) Light controls shoot meristem organogenic activity and leaf primordia growth during bud burst in *Rosa sp*. Plant, Cell and Environment **31:** 1534-1544

Synthèse bibliographique

1. Le genre *Rosa* : classification, historique et importance économique

1-1. Classification du genre *Rosa*

Les rosiers appartiennent à la famille des Rosacées qui compte près de 115 genres et 3200 espèces. Ils sont répandus à travers toutes les régions froides et tempérées de l'hémisphère Nord, depuis le cercle arctique jusqu'aux sous-tropiques, principalement dans les régions incluant les Etats-Unis, l'Iraq, l'Éthiopie, le Bengale et le sud de la Chine (Gudin, 2000). Le genre *Rosa* regroupe près de 150 espèces et près de 20 000 cultivars commerciaux (Rajapakse *et al*., 2001). La classification traditionnelle du genre *Rosa* est celle de Rehder (1947) remaniée par Wissemann en 2003.

Le genre *Rosa* est divisé en quatre sous-genres : (1) *Hulthemia*, (2) *Platyrhodon*, (3) *Hesperhodos* et (4) *Eurosa* ou *Rosa*. C'est ce dernier sous-genre, divisé en 10 sections, qui regroupe plus de 120 espèces botaniques (Rajapakse *et al.,* 2001). Malgré cette richesse potentielle, seules sept à dix espèces appartenant à trois sections ont été utilisées pour créer les nombreux cultivars commerciaux qui constituent la rose moderne (Martin *et al.*, 2001 ; Crespel *et al*., 2002).

Du fait de la complexité de plus en plus grande des hybridations entre espèces, variétés et cultivars, il est cependant devenu difficile d'utiliser seulement une classification botanique. Aussi, de nombreuses classifications horticoles ont vu le jour pour permettre de caractériser et de distinguer les formes modernes de rosiers. Un exemple de classification horticole basée sur les critères de remontée de floraison, de taille des fleurs et d'architecture de la plante est présenté dans le Tableau I. L'architecture y tient une place particulièrement importante et des rosiers aux ports différents (grimpant, buissonnant, nain…) sont ainsi proposés aux consommateurs (Figure 1).

1-2. Historique de la culture du genre *Rosa*

Il y a 5000 ans, les rosiers étaient déjà cultivés en Chine, en Asie et en Afrique du Nord (Sheperd, 1954). Des informations considérables sur les utilisations des rosiers dans l'Antiquité sont fournies par les écrits de l'historien grec Hérodote (490 – 420 avant J.C.), du philosophe grec Théophraste (372 – 387 avant J.C.) et du naturaliste romain Pline l'Ancien (23 – 79 après J.C.). Ce dernier relate que les romaines cultivaient des rosiers dans des serres qui pouvaient être chauffées par de l'eau chaude en hiver (Testu, 1984). En plus de leurs

nombreuses significations, les roses étaient admirées pour leurs pétales, comme source de parfum, et pour leurs fruits, les cynorhodons, en partie comestibles. Ainsi, plus de trente remèdes à base de différentes parties du rosier étaient utilisés par les romains (Gudin, 2000). Cultivée comme plante médicinale et décorative pendant plusieurs siècles, le rosier devient véritablement une plante horticole au 19ème siècle, grâce à l'intérêt que lui porte l'Impératrice Joséphine sous le 1er Empire. Les roses modernes, dont le processus de domestication s'est développé dès le 19ème siècle, résultent des nombreux croisements et hybridations réalisés entre les roses d'origine européenne et les roses d'origine chinoise (Martin *et al.*, 2001). Ceci a permis l'obtention d'une très grande variabilité génétique et la création de nouveaux cultivars aux caractères horticoles intéressants : résistance au froid, résistance aux maladies, duplicature florale et remontée de floraison (Maia & Venard, 1976).

1-3. Importance économique

Le genre *Rosa* est le genre économiquement le plus important de l'horticulture ornementale (Gudin, 2000). Différents types de production peuvent être distingués en fonction du type de rosier cultivé : production pour fleurs coupées, rosier de jardin de pleine terre, ou potées fleuries d'intérieur ou d'extérieur.

La rose est la fleur coupée dont la culture se développe le plus au plan mondial. Pendant longtemps, compte tenu du niveau élevé des investissements et des difficultés techniques (culture, manutention, transport…), la production était majoritairement localisée dans l'hémisphère Nord. Aujourd'hui, l'amélioration des techniques de manutention et des moyens de transport, ainsi que la création de variétés adaptées, permettent le développement de cette culture dans des contextes géographiques élargis, permettant ainsi de bénéficier à la fois d'un climat propice et de coûts de production (notamment de main d'œuvre) très bas. Si la production reste faible en Asie, elle se développe en Israël et dans certains pays africains (Kenya) et d'Amérique Latine (Équateur). Face à la forte concurrence internationale, une diminution des superficies produites est enregistrée en France depuis quelques années, et les importations, notamment des Pays-Bas, plate-forme commerciale importante, voient leur nombre augmenter (Oniflhor – TNS Sofrès, 2004).

Les rosiers de jardin constituent le deuxième type de production. Destinés à agrémenter les jardins, de nombreuses variétés ont vu le jour pour répondre aux besoins des consommateurs, qui disposent dorénavant de toutes sortes de plantes aux ports différents (Figure 1). Depuis une dizaine d'années, le marché du jardinage connaît une santé florissante.

Grâce à l'augmentation du temps libre des Français, notamment sous l'effet des 35 heures, et la multiplication des résidences individuelles, le marché a progressé de 8 % sur 5 ans et de 22 % sur les 10 dernières années pour atteindre un chiffre d'affaires estimé à 6,1 milliards d'€ TTC (Promojardin, 2007). En 2007, une augmentation des quantités vendues de 18 % (soit 8,5 millions rosiers) et du chiffres d'affaires de 20 % (64,7 millions d'€ TTC) ont été enregistrées (Viniflhor – TNS Sofrès, 2008), signes de l'intérêt toujours croissant des Français pour cette plante ornementale. Terre d'accueil de Jean-Pierre Vibert, premier horticulteur à se consacrer exclusivement au rosier de jardin en 1839, l'Anjou a su, depuis le début du 19ème siècle, faire prospérer la culture du rosier. Grâce au climat et à ses terres fertiles, la région Pays de la Loire constitue la 1ère région horticole française (SEM Pays de la Loire, 2008). La réputation de Doué la Fontaine en terme de rosier de jardin n'est plus à faire : la production y débuta dès la fin du 18ème siècle et elle demeure la capitale de la production de rosiers de pleine terre en Anjou. En 2007, plus de 60 rosiéristes y produisaient, sur une surface supérieure à 200 hectares, 7 millions de rosiers de jardin appartenant à environ 500 variétés (Substrats, 2007).

2. Qualité esthétique et architecture

La qualité esthétique d'un rosier est un critère commercial majeur, sur lequel les sélectionneurs mais aussi les horticulteurs vont porter toute leur attention. Le port de la plante, conditionné par son architecture, contribue fortement à l'esthétisme d'une plante ornementale. Après avoir défini les deux termes, qualité esthétique et architecture végétale, nous décrirons comment les pratiques horticoles peuvent contribuer à moduler le port des plantes ornementales et donc leur qualité esthétique, et en quoi des recherches fondamentales sont nécessaires pour progresser dans nos connaissances dans ce domaine.

2-1. Qualité esthétique

Selon Conover (1986), « la qualité d'un objet est un terme général applicable à tout caractère incluant un grade, un classement, un choix dans un groupe, la supériorité du type, de

la forme, de la couleur, de la taille, des potentiels de croissance et de développement, de la longévité et du prix de vente ». Pour une plante, le terme « qualité » recouvre trois composantes : (1) une composante visuelle, primordiale pour retenir l'attention du consommateur et déclencher l'acte d'achat, (2) une composante liée à l'état physiologique de la plante et (3) une composante économique. Ces trois composantes sont liées entre elles et contribuent à la prise en compte de nombreux facteurs, plus ou moins objectifs, dans l'étude de la qualité des végétaux d'ornement (Liguori-Loiseau, 1991).

La qualité esthétique d'une plante ornementale dépend de nombreux critères, comme par exemple la couleur du feuillage et sa densité, la morphologie des feuilles et leur état sanitaire, ainsi que différents aspects liés à la floraison : nombre de boutons floraux, couleur des fleurs, nombre de pétales… (Boumaza *et al*., 2009). A ces critères s'ajoutent ceux concernant l'architecture globale de la plante : les consommateurs s'intéressent alors particulièrement à la ramification, la vigueur des axes, ainsi qu'à l'aspect compact de la plante (Boumaza *et al*., 2009). En effet, le développement et l'agencement des axes constitutifs (branches, tiges...) peuvent aboutir à un déséquilibre spatial de l'architecture et ainsi compromettre l'aspect esthétique. Aussi l'architecture globale de la plante joue-t-elle un rôle essentiel dans la définition de la qualité esthétique.

2-2. Architecture végétale

2-2-1. Définition

L'architecture d'une plante représente l'ensemble des formes structurales que l'on peut observer à un moment donné (Oldeman, 1974). Elle est le résultat du fonctionnement des méristèmes apicaux, aériens et souterrains de la plante (Halle & Oldeman, 1970) et repose sur la nature des ramifications (par exemple : axes florifères ou végétatifs, axes courts ou longs…) et leur agencement. Elle est, à tout moment, l'expression d'un équilibre entre la régulation endogène des processus de croissance et les contraintes exercées par le milieu extérieur (Edelin, 1984).

2-2-2. Architecture du rosier buisson

Le rosier est un buisson dont le modèle architectural est celui de Champagnat (Figure 2, Halle & Oldeman, 1970). Ce modèle est caractérisé par des axes d'ordre I à croissance monopodiale, portant des ramifications orthotropes et acrotones. Ces ramifications sont, pour

la plupart, proleptiques : le bourgeon axillaire observe une phase de repos avant de débourrer. Il arrive cependant que certaines ramifications soient sylleptiques, notamment lorsqu'elles sont situées à proximité immédiate du bourgeon apical : le bourgeon axillaire formé produit aussitôt un axe secondaire, sans période de repos préalable.

Le développement d'un axe d'ordre I et de ses ramifications constitue l'unité architecturale (Barthélémy *et al.,* 1989), c'est-à-dire la structure architecturale élémentaire. Les travaux menés au sein de notre UMR ont montré que l'unité architecturale du rosier buisson était constituée de deux populations d'axes (rameaux longs et courts) distribués selon un chemin de ramification bien défini (les rameaux longs laissent place progressivement à des rameaux courts, majoritaires à partir de l'ordre IV). En fonction de la variété étudiée, l'unité architecturale s'achève au bout du IVème ou VIème ordre de ramification (Morel *et al.*, 2009). La forme buissonnante du rosier va alors être donnée par le développement de réitérations proleptiques, qui, dupliquant totalement ou partiellement l'unité architecturale, donnent naissance au complexe réitéré qu'est le buisson (Barthélémy *et al.,* 1989).

2-3. Apport des techniques horticoles dans la maîtrise de l'architecture de la plante

En ce qui concerne les rosiers de jardin, les producteurs cherchent à obtenir des rosiers ayant une structure équilibrée de port buissonnant, rampant ou grimpant. Pour obtenir un port buissonnant, la ramification basale est très importante. Des plants de qualité supérieure doivent donc porter plusieurs branches basales vigoureuses ayant un diamètre supérieur à 0,5 cm et dont l'orientation dans l'espace donnera une forme évasée à la plante adulte. L'Association Française de Normalisation (AFNOR) a d'ailleurs crée trois catégories pour classer les plants en fonction de ce critère : on sépare ainsi les plants qui ont deux (catégorie II), trois (catégorie I) ou quatre branches basales (catégorie extra).

Ces critères architecturaux basés sur la ramification basale vont dépendre du génotype de la plante mais aussi des différentes techniques de production appliquées aux plantes. La taille des plantes, manuelle ou mécanique, constitue le premier outil utilisé pour contrôler la ramification. Parallèlement, l'utilisation fréquente de nanifiants, molécules de synthèse qui freinent voire suppriment l'élongation, permet de réguler la croissance des plantes en diminuant la longueur de la tige par réduction des entrenœuds. Cependant, ces produits sont de moins en moins utilisés en horticulture au regard des risques qu'ils engendrent pour l'environnement et pour l'Homme, et bon nombre vont être retirés du marché prochainement.

Pour la profession horticole, il est alors urgent de rechercher d'autres procédés pour modifier l'architecture de la plante dans un cadre respectueux de l'environnement. Une alternative intéressante qui se développe consiste à s'appuyer sur la modulation des facteurs de l'environnement.

De nombreux travaux montrent en effet l'impact des facteurs de l'environnement sur le développement des plantes et leur architecture. La nutrition azotée est connue pour influencer la croissance (Millard & Proe, 1991 ; Cabrera, 2003) et ainsi modifier l'architecture. C'est ce qui a notamment pu être observé chez le rhododendron (*Rhododendron catawbiense* L.) où la ramification basale est favorisée par une privation temporaire en azote (Fustec & Beaujard, 2000). Chez l'hortensia (*Hydrangea macrophylla* L.), une forte diminution de l'humidité relative provoque un raccourcissement des tiges et permet ainsi la production de plantes plus compactes (Codarin *et al*., 2006). Plusieurs études ont également pu montrer l'importance de la température pour la croissance et notamment l'importance du différentiel de température jour/nuit. Chez le pétunia (*Petunia hybrida* L.), un différentiel négatif entraîne un raccourcissement des entrenœuds (Bachman & McMahon, 2006). En ce qui concerne l'impact de la lumière sur la croissance et l'architecture, plusieurs études ont été réalisées et montrent l'importance de ce facteur sur l'élaboration de l'architecture de la plante : celles-ci seront présentées dans le § 4.

Des outils appropriés ont été développés pour permettre de transférer ces résultats à des conditions de production. Ainsi, en serre, la fertilisation, l'irrigation, la température, l'hygrométrie et la lumière peuvent être régulées grâce à différents systèmes : cooling, humidificateurs, dispositifs d'irrigation automatique, d'éclairages photosynthétiques et photopériodiques, filtres et ombrières. Cependant, encore trop peu d'itinéraires culturaux s'appuient sur les travaux de recherche. Les connaissances sont en effet restreintes à trop peu d'espèces. Une analyse fine de l'effet des facteurs de l'environnement sur la physiologie de la plante et de ses conséquences sur l'architecture permettrait d'élargir nos connaissances, d'augmenter leur généricité et d'offrir, à terme, un plus large panel de possibilités de maîtrise de l'environnement à la profession horticole. Les recherches développées dans cette thèse vont dans ce sens.

3. Le débourrement des bourgeons

L'architecture d'une plante est en premier lieu la résultante du fonctionnement des bourgeons axillaires le long des axes. Leurs débourrements vont produire un certain nombre d'axes dont la longueur et l'orientation dans l'espace vont ensuite conditionner le port de la plante. Moduler l'architecture d'une plante peut donc consister à moduler la capacité de débourrement des bourgeons.

Le bourgeon axillaire végétatif est une entité complexe constituée d'écailles, de jeunes feuilles et de primordia foliaires recouvrant le méristème apical caulinaire, l'ensemble étant disposé sur un axe court constitué de l'empilement des entre-nœuds des feuilles préformées et des écailles (Figure 3). Le débourrement d'un bourgeon va nécessiter la levée de dormance dont il est fréquemment le siège, puis la reprise de croissance des pièces préformées (jeunes feuilles, entre-nœuds), ainsi que la reprise d'activité organogénétique du méristème apical caulinaire.

Dans ce chapitre, nous décrirons les processus physiologiques impliqués dans le débourrement, en mettant l'accent sur ceux qui ont fait l'objet de nos recherches, et sur lesquels les facteurs de l'environnement doivent agir pour moduler la capacité de débourrement des bourgeons.

3-1. Levée de dormance

Après sa formation, un méristème peut aussitôt produire une tige (rameau sylleptique) ou entrer en dormance au sein d'un bourgeon écailleux, avant de débourrer (rameau proleptique).

3-1-1. Définition des dormances

La dormance est définie comme étant une suspension temporaire de la croissance visible de toute structure végétale contenant un méristème (Lang *et al.*, 1987). Trois types de dormance peuvent alors être décrits selon les causes de l'arrêt de croissance et les besoins spécifiques pour le rompre (Horvath *et al.*, 2003):

- L'endodormance est induite par une inhibition de croissance dont l'origine se situe au sein même du méristème. Ainsi, aucune croissance ne peut être induite même lorsque le bourgeon est isolé (absence de paradormance) ou lorsqu'il est placé dans des conditions environnementales favorables (absence d'écodormance).

- La paradormance décrit une dormance induite par des facteurs internes à la plante, mais externes à l'organe affecté, telles que les inhibitions corrélatives, exercées à plus ou moins longue distance du méristème considéré, par d'autres organes de la plante. La dominance apicale, où le bourgeon situé au sommet de la pousse empêche le développement des bourgeons axillaires mis en place lors de la croissance de la tige, est un exemple de paradormance.
- L'écodormance, ou dormance induite par des facteurs environnementaux défavorables tels que les déficiences en nutriments, les stress hydriques, les niveaux limitants en CO_2 et O_2, les conditions extrêmes de température ou de lumière. Le méristème reprend son activité lorsque les conditions environnementales redeviennent favorables.

Il est à noter que ces trois types de dormance peuvent se succéder et/ou se superposer au cours du cycle annuel de la plante (Saure, 1985), ce qui rend difficile l'analyse des facteurs responsables dans chacun des cas (Mc Steen & Leyser, 2005).

3-1-2. Levée de l'endo- et de l'écodormance

Il est très difficile de séparer clairement les différents types de dormance entre eux puisque les mêmes facteurs environnementaux sont responsables chez de nombreuses espèces de l'induction et de la levée de l'endodormance, comme de l'écodormance (Horvath *et al.*, 2003). Ainsi, de nombreuses études portant sur l'effet des facteurs de l'environnement sur la dormance des bourgeons ne précisent pas clairement les phases de dormance concernées (endo- ou écodormance).

La température et la photopériode contrôlent à la fois l'induction et la levée de dormance. Chez de nombreuses espèces, la température est un facteur déterminant de la levée de dormance (Battey, 2000 ; Welling *et al.*, 2004). C'est par exemple le cas chez le bouleau pubescent (*Betula pubescens* L.), où une longue exposition à des températures relativement froides est nécessaire pour provoquer le débourrement au printemps (Murray *et al.*, 1989). Le mode d'action du froid sur la physiologie des bourgeons est encore mal connu (Penfield, 2008). Il a néanmoins été suggéré que le froid pourrait agir en provoquant la déméthylation de l'ADN observée lors de la dormance et la dé-répression de gènes liés à la reprise du cycle cellulaire des cellules méristématiques (Johnsen *et al.*, 2003). La lumière intervient également dans l'induction et la levée de dormance. C'est l'influence de la photopériode qui a été plus particulièrement étudiée. Il a pu être montré que, dans de nombreux cas, la dormance était induite par la diminution de la photopériode, associée ou non à la diminution des températures

(Thomas & Vince-Prue, 1997 ; Borchert, 2000). Au contraire, une photopériode longue a un effet favorable sur la levée de dormance des bourgeons de diverses espèces à feuilles caduques des régions nordiques (Heide, 1993). La qualité et l'intensité lumineuse vont également jouer un rôle dans le contrôle du débourrement des bourgeons : ces données seront présentées dans le § 4.

3-1-3. Levée de la paradormance

La paradormance est imposée au méristème par d'autres organes de la plante, situés à plus ou moins grande distance de ce méristème. Aussi, la seule suppression de l'organe inhibiteur (feuilles, tiges, bourgeons…) suffit à libérer le méristème de son inhibition et à provoquer le débourrement (Stafstrom, 2000).

Parmi les cas de paradormance, la dominance apicale est celle pour laquelle l'implication des hormones, notamment l'auxine et les cytokinines, est la mieux caractérisée (Ongaro & Leyser, 2008). L'auxine, synthétisée abondamment au niveau de l'apex et des jeunes feuilles (Ljung *et al.*, 2001), inhibe le débourrement des bourgeons axillaires. Elle est transportée de façon basipète le long des tiges (Blaskeslee *et al.*, 2005) via des transporteurs (Feraru & Friml, 2008), mais elle ne pénètre pas dans les bourgeons axillaires (Prasad *et al.*, 1993). L'auxine agit donc de façon indirecte pour inhiber le débourrement des bourgeons axillaires. Au contraire, les cytokinines ont une action directe et stimulent le débourrement (Cline, 1994). L'étude de mutants hyper-ramifiés appartenant à différentes espèces a permis l'identification d'une nouvelle hormone impliquée dans la régulation du débourrement. Les différents mutants *max* (*more axillary growth*) chez *Arabidopsis thaliana* (Booker *et al.*, 2004 ; Stirnberg *et al.*, 2002, 2007), *rms* (*ramosus*) chez le pois (*Pisum sativum* L., Beveridge *et al.*, 2000) et *dad* (*decreased apical dominance*) chez le pétunia (*Petunia sp.* : Napoli, 1996 ; Snowden & Napoli, 2003) ont contribué à la mise en évidence de la voie de signalisation d'une nouvelle hormone dérivée des caroténoïdes, et inhibitrice du débourrement. Cette hormone, la strigolactone, a récemment été identifiée chez le pois (*Pisum sativum* L., Gomez-Roldan *et al*., 2008). Les mutations de gènes orthologues de cette voie de signalisation chez le riz (*Oryza sativa* L.) ont permis l'augmentation du tallage (Ishikawa *et al.*, 2005 ; Zou *et al.*, 2006), suggérant ainsi que cette voie de signalisation serait présente largement au sein du règne végétal.

Plusieurs résultats laissent penser que ces trois hormones sont étroitement liées et agissent en interaction dans le contrôle du débourrement. L'auxine inhiberait la synthèse des cytokinines au sein de la plante entière (Nordström *et al*., 2004) et interviendrait également

dans la régulation de certains gènes *MAX*, notamment *MAX4* (Bainbridge *et al*., 2005), qui contrôlent la voie de biosynthèse de la strigolactone. De plus, chez les mutants *max/rms/dad*, on note une accumulation des transporteurs d'auxine PIN (Bennett *et al.*, 2006) mais également une diminution des taux de cytokinines (Foo *et al*., 2007). Ceci suggère l'implication des protéines MAX/RMS/DAD à la fois dans la régulation du transport de l'auxine et dans la voie de biosynthèse des cytokinines. Un modèle regroupant l'ensemble des données existantes a ainsi été proposé (Figure 4, Ongaro & Leyser, 2008) : il présente, au sein du bourgeon, les différentes voies de régulation de l'auxine, des cytokinines et de la strigolactone intervenant dans le contrôle du débourrement des bourgeons.

3-2. Reprise de croissance

3-2-1. Reprise de l'activité organogénétique du méristème apical caulinaire

Chez les végétaux supérieurs, le méristème caulinaire de l'embryon génère l'ensemble des parties aériennes de la plante. Ce méristème est constitué d'une zone centrale, d'un anneau initial, ou zone périphérique, et d'une zone médullaire (Figure 3B). Les cellules souches de la zone centrale sont capables, tout au long de la vie de la plante, de produire à la fois des cellules identiques à elles-mêmes et des cellules destinées à se différencier pour produire, dans les zones périphériques et médullaires, les organes et les tissus de l'appareil aérien (Beveridge *et al*., 2007).

Plusieurs processus interdépendants vont intervenir lors de la formation des organes : (1) sélection du site d'initiation du futur organe foliaire au niveau du méristème, (2) recrutement des cellules méristématiques au site d'initiation du primordium, (3) croissance de l'organe puis (4) séparation des organes et détermination de leur identité. Bien qu'il soit difficile de définir la succession exacte de ces évènements au cours du développement d'un organe, l'un des premiers processus observé est la séparation, au sein du méristème, d'un groupe de cellules destinées à former un initium, ce qui se traduit par un bombement au niveau de la zone périphérique.

Chez les cellules végétales, la croissance est un phénomène biophysique impliquant un équilibre entre la turgescence de la cellule et les forces externes s'exerçant contre la paroi (Cosgrove, 2000a). Tandis que la pression de turgescence interne reste généralement constante durant la croissance, la paroi cellulaire subit des variations de son extensibilité (Fleming, 2002). Ce sont ces changements qui permettent l'augmentation de la taille des

cellules. Plusieurs protéines sont impliquées dans le relâchement des parois (Cosgrove, 2005), notamment les expansines, décrites dans le § 3-2-3-2-2. Lorsque le relâchement de la paroi cellulaire est induit expérimentalement par l'application localisée des ces protéines au niveau de la zone périphérique du méristème apical, un nouveau primordium est initié à cet endroit, comme cela a été montré chez la tomate (*Solanum lycopersicum*, Fleming *et al.*, 1997).

3-2-2. Reprise de croissance des primordia foliaires et des entre-nœuds

Lors du débourrement du bourgeon, la jeune tige grandit grâce à l'élongation de l'entre-nœud sous-jacent à chaque feuille préformée, ce qui laisse ainsi la place à ces dernières pour se développer.

La croissance des jeunes feuilles est le résultat de divisions et d'élongations cellulaires (pour revue, Tsukaya, 2006). Ces processus sont en partie régulés par l'action de différentes hormones. L'auxine, impliquée dès la sélection du site de formation de l'initium foliaire (Reinhardt *et al.*, 2000 ; Fleming, 2005), régulerait l'expression de gènes contribuant à la croissance du primordium foliaire, notamment celle des gènes codant des expansines (Reinhardt *et al.*, 1998). Les cytokinines jouent également un rôle dans la croissance foliaire puisque la surexpression d'un gène hydrolysant les cytokinines, *AtCKX*, conduit à une diminution significative de la surface foliaire (Werner *et al.*, 2003).

Les gibbérellines et les brassinostéroïdes sont impliqués dans la régulation de l'élongation des entre-nœuds. En effet, les mutants liés à ces deux hormones présentent un phénotype nain attribuable à une élongation réduite des tiges (Talon *et al.*, 1990 ; Fujioka & Yokota, 2003 ; Sakamoto *et al.*, 2004).

3-2-3. Divisions et élongations cellulaires au cours du débourrement

Le débourrement d'un bourgeon est la résultante de l'élongation des entre-nœuds, de la croissance des feuilles préformées et de la formation de nouveaux primordia foliaires par le méristème. Croissance et organogenèse impliquent deux processus majeurs : les divisions et les élongations cellulaires. Le lien entre ces deux processus a fait l'objet de nombreux travaux. Bien qu'ils soient souvent considérés comme un seul processus de croissance cellulaire, la part relative de chaque mécanisme est mal connue (Fleming *et al.*, 1999). Néanmoins, plusieurs travaux suggèrent que l'élongation cellulaire, et non les divisions cellulaires, constitue la force motrice nécessaire à la croissance et à l'organogenèse. En effet, le blocage des divisions cellulaires, par irradiation ou par traitement chimique, n'empêche pas l'initiation de nouveaux primordia (Foard, 1971 ; Grandjean *et al.*, 2004).

3-2-3-1. Divisions cellulaires

Chez les bourgeons dormants, les divisions cellulaires sont bloquées et les cellules du méristème peuvent être stoppées en différents points du cycle cellulaire : en phase G_0 comme chez la pomme de terre (*Solanum tuberosum*, Campbell *et al.*, 1996) ou en phase G_1, S ou G_2 comme chez le pois (*Pisum sativum* L., Devitt & Stafstrom, 1995). Lors du débourrement, le cycle cellulaire reprend de façon synchronisée dans les cellules méristématiques.

La progression des différentes phases du cycle cellulaire est régulée par une famille de protéines kinases cycline-dépendantes (CDK). La cycline constitue la sous-unité régulatrice, tandis que la protéine kinase CDK constitue la sous-unité catalytique du complexe CDK-cycline. Les différentes protéines kinases CDK et les différentes cyclines connues jusqu'à présent sont regroupées en différentes classes selon leurs profils d'expression : certaines protéines kinases CDK sont effectivement exprimées tout au long du cycle cellulaire alors que d'autres sont exprimées à un moment donné du cycle cellulaire (pour revue, Dewitte & Murray, 2003). L'expression de certaines cyclines semble bien refléter l'état de croissance d'un bourgeon : Devitt & Stafstrom (1995) ont montré une accumulation de transcrits cdc2 (protéine kinase cycline dépendante) et de cycline B au sein de bourgeons de pois (*Pisum sativum* L.) sortant de dormance.

3-2-3-2. Elongation et croissance cellulaires

3-2-3-2-1. La paroi pectocellulosique

La paroi pectocellulosique présente chez les plantes est un élément structural important qui distinguent les cellules végétales de toutes les autres cellules eucaryotes. Ces parois, d'une épaisseur d'environ 0,2 µm, fournissent un support mécanique en entourant et en maintenant la plupart des cellules végétales. Grâce à leur élasticité et à leurs propriétés mécaniques, elles sont associées au développement et à la croissance cellulaire. Les parois jouent également un rôle important en relayant les informations provenant de stimuli externes et en permettant la communication symplastique (Pilling & Höfte, 2003).

3-2-3-2-1-1. Rôle mécanique et composition de la paroi pectocellulosique

Outre le fait que la paroi cellulaire définit la forme d'une cellule, une de ses fonctions principales est de résister à la pression de turgescence de la cellule. La pression de turgescence, plus ou moins constante pendant la croissance, fournit une force hydrostatique

qui plaque la membrane plasmique contre la paroi cellulaire (Hopkins, 2003). Pour cette raison, la paroi cellulaire est renforcée latéralement. Elle est organisée en feuillets de microfibrilles de cellulose - des faisceaux de longs polymères linéaires de glucose contenant de nombreuses liaisons hydrogène, associés par des liaisons β-glycosidiques. Les microfibrilles de cellulose sont enchâssées dans une matrice constituée de pectine (un polymère d'acide D-galacturonique et d'autres monosaccharides) et d'hémicellulose (un court polymère abondamment ramifié, constitué de plusieurs monosaccharides à cinq ou six carbones). La résistance mécanique de la paroi cellulaire repose sur les liaisons croisées entre les microfibrilles et les chaines d'hémicellulose, qui empêchent la paroi cellulaire de s'étirer latéralement.

Les parois cellulaires primaires de type I (retrouvées chez la majorité des plantes à fleurs) et de type II (spécifique aux Poacées) contiennent 30 % de cellulose mais diffèrent grandement au niveau de la composition de la matrice (Carpita & Gibeaut, 1993). Chez les parois de type I, les matrices sont composées de xyloglucanes (25 %), de pectines (30 %) et de protéines riches en hydroxyproline (5 à 10 %). Les parois de type II possèdent moins de pectine (5 à 10 %), moins de protéines riches en hydroxyproline (0,5 à 1 %) et moins de xyloglucanes (2 à 5 %). Elles sont par contre riches en glucuronoarabinoxylanes (30 %) et en divers β-glucanes (25 %).

3-2-3-2-1-2. Mécanismes de relâchement de la paroi

Puisque la paroi cellulaire entourant une cellule végétale empêche celle-ci de s'étendre, sa structure doit se relâcher lorsque la cellule grandit. L'expansion cellulaire est un processus complexe initié par l'augmentation de la pression de turgescence et suivi par un relâchement contrôlé de la paroi, concomitant à une nouvelle déposition d'éléments constitutifs de la paroi (Cosgrove, 1993 ; Refrégier *et al.*, 2004 ; Humphrey *et al.*, 2007). Néanmoins, les signaux qui permettent la déformation et l'extension de la paroi pendant la croissance ne sont pas clairement identifiés.

L'acidification de la paroi (Rayle & Cleland, 1992) ainsi que son état d'hydratation (Cosgrove, 1997) contribuent à l'augmentation rapide de l'extensibilité des parois. Après une acidification du milieu de pH 6-7 à pH 4,5-5, les parois commencent à se relâcher et leur capacité d'étirement peut augmenter de cinq à dix fois (Cosgrove, 1993). Bien que des protéines permettant l'extension des parois cellulaires et dont l'activité dépend du pH aient été découvertes : les expansines (McQueen-Mason *et al.*, 1992), les modes d'actions de ces protéines restent incompris.

Le relâchement de la paroi nécessite la rupture d'interactions moléculaires entre les différents composants de la paroi cellulaire. Il est généralement admis que l'extensibilité de la paroi dépend du nombre de liaisons - ponts hydrogène - entre cellulose et hémicellulose ainsi qu'entre hémicellulose et matrice extracellulaire (Cosgrove, 2000a). Le clivage des polymères de la matrice et l'affaiblissement des liaisons non-covalentes entre les polysaccharides peuvent être réalisés par plusieurs protéines, notamment les xyloglucan-endotransglycosylases/hydrolases (XTH), les endo-(1,4)-β-d-glucanases ou les expansines. Il semblerait donc que l'extension *in vivo* soit contrôlée par l'action combinée de ces différentes protéines (Darley *et al.*, 2001 ; Cosgrove, 2005).

Lorsque l'expansion cellulaire est terminée, des liaisons de différents types - hydrogène, calciques, de Van der Waals - sont établies entre les composants de la paroi afin de la rigidifier (Passardi *et al.*, 2004). Cette étape de rigidification fait intervenir différentes enzymes, notamment des peroxydases et des extensines (Humphrey *et al.*, 2007).

3-2-3-2-2. Implication des expansines dans l'élongation cellulaire

Les expansines sont de petites protéines sécrétées en faible quantité au niveau de la paroi cellulaire. Elles peuvent directement se lier à la cellulose et participeraient ainsi au relâchement de la paroi en interrompant les liaisons non-covalentes entre cellulose et polymères de la matrice extracellulaire (McQueen-Mason & Cosgrove, 1995).

3-2-3-2-2-1. Classification des expansines

Les expansines appartiennent à une famille multigénique et sont présentes chez les mousses, les fougères, les gymnospermes et les angiospermes. Elles sont divisées en deux groupes : les α-expansines (EXPA) et les β-expansines (EXPB) (Sampedro & Cosgrove, 2005 ; Choi *et al.*, 2006 ; Sampedro *et al.*, 2006). Des gènes présentant de fortes similarités avec les gènes d'expansines ont également été identifiés et classés parmi les expansines-like A (EXLA) et les expansines-like B (EXLB) ; leur fonction biologique est cependant inconnue.

Les α-expansines ont été les premières expansines découvertes. Elles ont tout d'abord été isolées à partir de parois cellulaires d'hypocotyles de concombre (*Cucumis sativus*, McQueen-Mason *et al.*, 1992) puis à partir de parois cellulaires de coléoptiles d'avoine (*Avena sativa*, Li *et al.*, 1993). Des protéines caractérisées chez des grains de pollens de graminées présentant entre 25 et 30 % d'homologie avec les α-expansines ont pu être identifiées (Shcherban *et al.*,

1995) et, après avoir montré leur activité sur l'extensibilité des parois cellulaires, ont été classées parmi les β-expansines (Cosgrove *et al.*, 1997).

Pour une plante donnée, plusieurs gènes codent des expansines (Sampedro & Cosgrove, 2005). Le génome complet d'*Arabidopsis thaliana* en compte 36 (26 EXPA, 6 EXPB, 3 EXLA, 1 EXLB) et on en dénombre 58 (34 EXPA, 19 EXPB, 4 EXLA, 1 EXLB) chez le riz (*Oryza sativa* L.). La signification fonctionnelle de ces nombreux gènes d'expansines présents dans le génome est encore mal comprise (Cosgrove, 1998). La raison principalement évoquée est que la multiplicité de gènes d'expansine reflète la nécessité d'un contrôle fin des activités de ces protéines en fonction des tissus et des différents stades de développement des plantes.

3-2-3-2-2-2. Structure et régulation de l'activité des expansines

Les expansines sont des protéines alcalines (point isoélectrique = 9,1 – 9,5 chez une expansine de maïs, Li *et al.*, 2003) composées de 250 à 270 acides aminés. Trois régions peuvent être distinguées : (1) le *peptide signal*, en position N terminale, composé de 20 à 30 acides aminés, permet le ciblage des protéines vers le réticulum endoplasmique, (2) le *domaine 1*, adjacent au peptide signal est composé de 120 à 135 acides aminés et inclut une série de résidus cystéine conservés (8 chez les α-expansines et 6 chez les β-expansines), un motif conservé (His-Phe-Asp), et une petite région alcaline enrichie par des résidus lysine et arginine, (3) le *domaine 2*, en position C terminale, comprend 90 à 120 acides aminés et est caractérisé par la présence de 4 résidus tryptophane conservés. La structure tridimensionnelle des expansines présente à la fois des similarités avec le domaine catalytique des endoglucanases fongiques et le domaine de liaison à la cellulose des cellulases bactériennes (Shcherban *et al.*, 1995 ; Cosgrove *et al.*, 1997 ; Cosgrove, 2000a,b ; Sampedro & Cosgrove, 2005).

Les expansines sont des protéines conservées. Par exemple, CsEXPA1 (α-expansine 1 de l'hypocotyle de concombre) est identique à plus de 80% avec PrEXPA1 (α-expansine 1 de l'hypocotyle de pin). En général, les séquences protéiques des différentes α-expansines sont identiques entre 60 et 90 % (Cosgrove, 1998). Les β-expansines sont caractérisées par une plus grande diversité. Au sein de ce groupe, les homologies de séquences protéiques atteignent 28 à 76 %. D'un point de vue de la structure tridimensionnelle, les α et les β-expansines sont similaires à 75% (Cosgrove *et al.*, 1997).

3-2-3-2-2-3. Mode d'action des expansines

Le site d'action de l'expansine est inconnu. Les résultats d'analyses immuno-histochimiques suggèrent que les expansines sont présentes au niveau de l'ensemble de la paroi cellulaire et en faibles quantités (Lee & Choi, 2005 ; Choi *et al.*, 2006).

Le mécanisme d'action de l'expansine dans le relâchement de la paroi cellulaire a été principalement étudié chez le concombre et le maïs. Il a pu être montré que l'expansine CsEXPA1 ne possédait aucune activité de type endoglucanase, exoglucanase, pectinase et xyloglucane-endotransglycosylase (McQueen-Mason *et al.*, 1993 ; McQueen-Mason & Cosgrove, 1995) et que l'expansine ZmEXP1B n'avait pas d'activité hydrolytique (Yennawar *et al.*, 2006).

Plusieurs expériences ont été réalisées afin de déterminer les cibles des expansines. La liaison de CsEXPA1 à la cellulose, les xyloglucanes et l'hémicellulose (McQueen-Mason & Cosgrove, 1995) suggère que les glucanes constituent les principales cibles des α-expansines. Les expansines agiraient donc principalement au niveau de la force d'interaction entre cellulose et xyloglucanes en clivant les liaisons hydrogène qui les relient (McQueen-Mason & Cosgrove, 1994, 1995 ; Cosgrove, 2005). Ceci rendrait alors les polymères carbonés plus accessibles aux enzymes de dégradation (Brummell *et al.*, 1999) ou de rigidification de la paroi cellulaire (Zenoni *et al.*, 2004). Cependant, aucune méthode physique n'a pu, à l'heure actuelle, permettre l'observation de l'augmentation de la mobilité des chaînes d'hémicellulose suite à l'action des expansines (Cosgrove, 2000a ; Marga *et al.*, 2005).

3-2-3-2-2-4. Rôles des expansines

- Dans l'expansion cellulaire au cours de la maturation de différents organes

Chez la tomate (*Solanum lycopersicum*, Catala *et al.*, 2000), la poire (*Pyrus communis*, Hiwasa *et al.*, 2003), la fraise (*Fragaria ananassa*, Harrison *et al.*, 2001) et la pêche (*Prunus persica* L., Hayama *et al.*, 2003), l'expansion cellulaire est accompagnée de l'expression de gènes d'expansines et l'accumulation d'ARNm de certaines expansines (*LeEXPA2* pour la tomate et *PpEXPA2* pour la pêche) est corrélée avec la croissance.

La chute des feuilles, des fleurs et des fruits est permise par la formation d'une zone d'abscission à la base des pétioles et des pédicelles. La formation de cette zone, contrôlée par l'éthylène, entraîne une destruction des parois cellulaires sous l'action de plusieurs enzymes et également sous l'action des expansines (Belfield *et al.*, 2005 ; Sharova, 2008). Chez le rosier, l'augmentation de l'expression d'une α-expansine est corrélée à l'abscission des pétales (*Rosa bourboniana*, Sane *et al.*, 2007).

- Dans l'activité organogénique du méristème

La plupart des études concernant les expansines ont été réalisées sur l'hypocotyle, les feuilles, les racines ou les coléoptiles. Toutefois, l'implication des expansines dans l'organogenèse a pu aussi être mise en évidence par l'application localisée de ces protéines au niveau du méristème de tomate (*Solanum lycopersicum*, Fleming *et al.*, 1997). Ce dépôt d'α-expansines au sein de l'apex a permis la formation ectopique d'un nouveau primordium et a entrainé une modification de la phyllotaxie. L'initiation d'un primordium foliaire a également pu être observée après application de tétracycline, au niveau de l'apex de tabac transformé par le gène *CsEXPA1* (α-expansine 1 de concombre) sous le contrôle d'un promoteur inductible par cette molécule (*Nicotiana tabacum*, Pien *et al.*, 2001). Ces résultats suggèrent que les expansines sont présentes au site même d'initiation du primordium, et que la transcription et la traduction ont également lieu à cet endroit du méristème. Ceci a en partie été vérifié chez la tomate (*Solanum lycopersicum*), où les ARNm *LeEXPA9* et *LeEXPA18,* ainsi que la protéine LeEXPA18, ont pu être détectés au sein du méristème apical, majoritairement au niveau du site d'initiation des primordia foliaires (Reinhardt *et al.*, 1998 ; Vogler *et al.*, 2003).

- Dans la morphogenèse foliaire

Chez le tabac transformé avec le gène *CsEXPA1* sous contrôle d'un promoteur inductible par la tétracycline, la morphologie des feuilles a pu être modifiée localement par l'application de tétracycline chez un primordium en croissance, suggérant ainsi le rôle de l'expansine dans la morphogenèse foliaire (Pien *et al*., 2001). Ce résultat est corrélé avec ce qui avait été précédemment observé chez *Arabidopsis thaliana* : l'inhibition de l'expression du gène *AtEXPA10* conduit à la formation de feuilles naines à la morphologie altérée (Cho & Cosgrove, 2000). Au contraire, la surexpression du gène *AtEXPA10* permet l'augmentation de la longueur des pétioles et de la surface foliaire (Cho & Cosgrove, 2000). Chez le peuplier tremble (*Populus tremula L. × P. tremuloides Michx*), un résultat similaire est observé lorsque l'expansine *PttEXPA1* est surexprimée (Gray-Mitsumune *et al.*, 2008). Chez la fétuque (*Festuca pratensis*, Reidy *et al.*, 2001), le riz (*Oryza sativa* L., Lee & Kende, 2001) et le blé (*Triticum aestivum*, Lin *et al.*, 2005), il y a accumulation d'ARNm d'expansines dans les feuilles en croissance, ce qui suggère l'implication de ces protéines lors de la morphogenèse foliaire.

L'ensemble de ces résultats a permis de montrer la présence des expansines au sein du méristème apical caulinaire et des primordia foliaires, ainsi que leur rôle dans l'organogenèse et la croissance des jeunes feuilles. Le débourrement des bourgeons étant la résultante de ces deux mécanismes et de l'élongation des entre-nœuds, ces résultats suggèrent le rôle important des expansines au cours de ce processus.

3-3. Besoins en eau lors de la reprise de croissance

La croissance du bourgeon est régie par l'évolution temporelle d'un ensemble de processus d'inhibitions (dormances) et de stimulations qui conduisent ou non au débourrement. Lorsque les inhibitions sont levées, le débourrement du bourgeon, organe hétérotrophe, nécessite l'apport ou la synthèse de diverses molécules. C'est le cas de l'eau.

McIntyre (1987) postule que l'eau est l'élément principal de la régulation de tous les processus de développement des plantes, l'eau étant le facteur qui limite le taux de croissance et les activités métaboliques. L'eau pourrait donc intervenir dans le contrôle du débourrement des bourgeons. Il a été montré, dans les bourgeons dormants de frêne (*Fraxinus excelsior* L.), qu'une teneur en eau inférieure à 60 % provoque le blocage des divisions cellulaires (Cottignies, 1983, 1987). Juste avant le débourrement des bourgeons, une réhydratation brusque du bourgeon est observée. L'augmentation de la teneur en eau serait alors nécessaire aux activités enzymatiques et donc à la reprise du métabolisme cellulaire.

Chez le bouleau (*Betula pubescens* L.), la période de fin de dormance correspond aussi à une augmentation rapide de la teneur en eau dans les bourgeons (Rinne *et al.*, 1994). Une augmentation similaire a été observée au sein des bourgeons végétatifs de pêcher (*Prunus persica* L.: Monet, 1983 ; Bonhomme, 1998).

3-4. Besoins en nutriments lors de la reprise de croissance

L'hypothèse du contrôle trophique de la levée de dormance, initialement proposée chez le topinambour (*Helianthus tuberosus*, Gendraud & Pétel, 1990), se base sur la capacité d'importation et d'utilisation des nutriments carbonés par le méristème et les ébauches foliaires. Le bourgeon étant constitué d'organes hétérotrophes (Tort, 1996), sa croissance va donc dépendre des réserves qu'il a accumulées et/ou de sa capacité à importer des nutriments et à les utiliser.

Chez les végétaux, il existe plusieurs formes de réserves : l'amidon, les sucres solubles (saccharose, glucose, fructose, sorbitol, raffinose, stachyose…), les lipides et les composés azotés (protéines et acides aminés). L'objet de ce travail ayant en partie porté sur les réserves glucidiques, seules celles-ci seront présentées.

3-4-1. L'amidon

L'amidon constitue un produit de réserve très abondant chez les végétaux. Composé de molécules de glucose, l'amidon est hydrolysé sous l'action d'amylases ou de phosphorylases en maltose puis en glucose. En cas de forte demande en glucose, c'est par l'action des amylases que l'amidon est dégradé.

Chez l'érable sycomore (*Acer pseudoplatanus* L., Catesson, 1964), le frêne (*Fraxinus excelsior* L., Cottignies, 1986) et le bouleau (*Betula pubescens* L., Rinne *et al.*, 1994), les réserves glucidiques sont essentiellement constituées d'amidon et la reprise d'activité des bourgeons s'accompagne d'une forte diminution des réserves amylacées. Chez les bourgeons de peuplier (*Poplar sp.*, Bonicel *et al.*, 1987) et de pommier (*Malus domestica* L. Borkh., Brunel, 2001), une hydrolyse de l'amidon a également été observée au cours du débourrement. Chez la vigne (*Vitis vinifera* L.), il a été montré que l'hydrolyse débutait tout d'abord au niveau du méristème et qu'elle se propageait dans les autres régions du bourgeon (Koussa *et al.*, 2001). Les sucres solubles ainsi formés fournissent l'énergie nécessaire à la croissance du bourgeon.

Chez le rosier, les réserves carbonées au sein du bourgeon végétatif n'ont été que peu étudiées. La majorité des travaux sont liés à l'étude de l'amélioration de la qualité et de la tenue en vase des fleurs et, par conséquent, portent sur les pétales. Le bouton floral en croissance se comporte comme un organe puits (Kumar *et al.*, 2008) et, lors de son ouverture, une hydrolyse des réserves amylacées de ce bouton a pu être constatée (Sood *et al.*, 2006 ; Kumar *et al.*, 2007 ; Yamada *et al.*, 2007).

3-4-2. Le sorbitol

Le sorbitol est un polyol acyclique (alditol) à six carbones, le groupement aldéhyde ou cétone a été réduit en une fonction hydroxyle (-OH). Il est classiquement retrouvé chez certaines espèces de la famille des Rosacées (genres *Prunus*, *Pyrus* et *Malus*) et des Plantaginacées (genres *Plantago* et *Littorella*). Outre son rôle de source de carbone, le sorbitol est également décrit comme étant une molécule intervenant dans la régulation de

l'osmolarité (Loescher, 1987) et dans le mécanisme de protection contre le froid (Bieleski, 1982).

3-4-2-1. Synthèse

Les polyols sont des molécules dérivées des glucides (Figure 5) ; c'est la réduction du glucose-6-phosphate par la sorbitol-6-phosphate déshydrogénase NADP-dépendante (NADP-S6PDH, EC 1.1.1.200) et la sorbitol-6-phosphate phosphatase qui conduisent au sorbitol (S6PP, EC 3.1.3.50) (*Malus domestica* : Negm & Loescher, 1981 ; Zhou *et al.*, 2003). Cette synthèse de sorbitol est réalisée dans les organes sources. Chez le pommier (*Malus domestica*, Hansen, 1970), le pêcher (*Prunus persica* L., Moing *et al.*, 1992) et l'abricotier (*Prunus armeniaca*, Bieleski & Redgwell, 1985), le sorbitol représente 60 à 90% du carbone exporté par les feuilles via le phloème. Le sorbitol peut également être formé par réduction du fructose sous l'action de la sorbitol déshydrogénase NAD-dépendante (NAD-SDH, EC 1.1.1.14) (Negm & Loescher, 1979). C'est ce qui a pu être observé chez le maïs (*Zea mays*, Doehlert, 1987) et le soja (*Glycine max*, Kuo *et al.*, 1990).

3-4-2-2. Dégradation

La dégradation du sorbitol est limitée aux organes puits tels que les bourgeons et les jeunes feuilles. Elle dépend de l'activité de trois enzymes (Figure 5) : la sorbitol oxydase (SOX, EC 1.1.3.-), la sorbitol déshydrogénase NAD-dépendante (NAD-SDH, EC 1.1.1.14) et la sorbitol déshydrogénase NADP-dépendante (NADP-SDH, EC 1.1.1.14). La NAD-SDH, enzyme cytoplasmique, est la seule à produire du fructose, les deux autres enzymes produisant du glucose.

La NAD-SDH a été purifiée et caractérisée à partir de différents fruits (*Malus domestica*, Yamaguchi *et al.*, 1994 ; *Pyrus serotina*, Oura *et al.*, 2000) et le clonage de l'ADNc chez plusieurs espèces a révélé l'existence d'un nombre variable d'isoformes en fonction de l'espèce. Une seule isoforme a été caractérisée chez le néflier du Japon (*Eriobotrya japonica*, Bantog *et al.*, 2000) et le pêcher (*Prunus persica* L., Yamada *et al.*, 2001). On en dénombre quatre chez le pommier (*Malus domestica*, Park *et al.*, 2002) et cinq chez le nachi (*Pyrus pyrifolia*, Ito *et al.*, 2005). Ces deux derniers travaux suggèrent une répartition en deux groupes des différentes isoformes : certaines ne seraient exprimées que dans les tissus puits et d'autres seraient exprimées également au niveau des feuilles. Chez le pêcher (*Prunus persica* L.), la NAD-SDH est définie comme un marqueur de croissance des organes puits (Lo Bianco *et al.*, 1999a,b).

3-4-2-3. Transport

Le sorbitol est transporté à longue distance des organes sources vers les organes puits par l'intermédiaire de la sève phloémienne (*Prunus persica* L., Moing *et al.*, 1992). Des travaux montrent également un transport xylémien chez le pommier (*Malus sylvestris*), lors de la période automno-hivernale (Williams & Raese, 1974) en relation avec les températures froides.

Au niveau cellulaire, plusieurs transporteurs de sorbitol ont été caractérisés chez le cerisier (*Prunus cerasus*, Gao *et al.*, 2003) et le pommier (*Malus domestica*, Watari *et al.*, 2004). La protéine est constituée de onze segments transmembranaires, avec l'extrémité N-terminale intracellulaire et l'extrémité C-terminale extracellulaire (Gao *et al.*, 2003). La mesure de l'absorption de sorbitol sur fractions enrichies en vésicules de plasmalemme issues de feuilles de pêcher (*Prunus persica* L. Batsch.) suggèrent que le transport de sorbitol est dépendant d'un symport H^+/sorbitol (Marquat *et al.*, 1997).

3-4-2-4. Implication du sorbitol dans le débourrement

La majorité des études concernant le sorbitol portent sur le rôle de ce sucre au sein des fruits, lors de leur croissance ou de leur maturation (*Prunus domestica*, Usenik *et al*., 2008 ; *Prunus persica* L., Morandi *et al.*, 2008), ou dans les mécanismes concernant la régulation de l'osmolarité (Loescher, 1987) ou de protection contre le froid (Bieleski, 1982). L'étude du rôle du sorbitol au sein des bourgeons végétatifs n'a été réalisé que chez le pêcher (*Prunus persica* L. Batsch. : Marquat *et al.*, 1999 ; Maurel *et al.*, 2004b) lors de la période précédent le débourrement. Au cours de cette période, le sorbitol est fortement absorbé par les bourgeons. Il est alors dégradé en glucose et fructose, molécules nécessaires à la reprise de l'activité méristématique.

3-4-3. Le saccharose

Le saccharose est, généralement, le glucide majoritaire issu de la photosynthèse. Il est le seul disaccharide non-réducteur formé par l'association d'une molécule de fructose et d'une molécule de glucose. Source de carbone et d'énergie produite par les organes sources, et distribué dans les organes puits où il servira à la croissance et à la formation de réserves, le saccharose constitue également une molécule signal (Rolland *et al.*, 2006).

3-4-3-1. Synthèse

Le saccharose est synthétisé dans les cellules des organes sources et il existe plusieurs voies de synthèse conduisant à sa formation (Figure 6). La principale voie implique la sucrose phosphate synthase (SPS, EC 2.4.1.14), enzyme qui catalyse la condensation de l'UDP-glucose et du fructose-6-phosphate. Le saccharose-6-phosphate ainsi formé est alors déphosphorylé par la sucrose phosphate phosphatase (SPP, EC 3.1.3.24). L'autre voie de synthèse implique la saccharose synthase (SUSY, EC 2.4.1.13), qui catalyse l'association de l'UDP-glucose avec le fructose, produisant ainsi du saccharose et de l'UDP, selon une réaction réversible.

3-4-3-2. Dégradation

La dégradation du saccharose implique deux enzymes différentes, la saccharose synthase (SUSY, EC 2.4.1.13) et les invertases (β-fructofuranosidases, EC 3.2.1.26) (Figure 6). Alors que les invertases catalysent une réaction irréversible qui conduit à la formation de glucose et de fructose, la réaction catalysée par la SUSY est réversible. Dans ce cas, le saccharose et de l'UDP sont convertis en UDP-glucose et fructose. L'UDP-glucose participe à la formation des composants de la paroi pectocellulosique tels que la cellulose et à la formation d'amidon après conversion en glucose-1-phosphate par une UDP-glucose pyrophosphorylase (EC 2.7.7.9). Le fructose formé par dégradation du saccharose peut servir à la glycolyse ou être converti en UDP-glucose.

Plusieurs isoformes de SUSY, aux caractéristiques biochimiques voisines, ont été caractérisées chez les végétaux. On dénombre six gènes putatifs codant des SUSY chez *Arabidopsis thaliana* (Baud *et al.*, 2004 ; Bieniawska *et al.*, 2007), trois gènes chez le pois (*Pisum sativum* L., Barratt *et al.*, 2001), deux gènes chez le maïs (*Zea mays*, Chourey *et al.*, 1998), la pomme de terre (*Solanum tuberosum*, Fu & Park, 1995), et la carotte (*Daucus carota*, Sturm *et al.*, 1999). Ces enzymes peuvent être trouvées dans le cytosol, permettant ainsi la formation des hexoses nécessaire au métabolisme cellulaire, mais également associées à la membrane plasmique ou aux mitochondries (Koch, 2004 ; Subbaiah *et al.*, 2006).

Les invertases sont divisées en trois classes en fonction de leur localisation cellulaire et de leurs propriétés biochimiques (Sturm, 1999) : (1) les invertases cytosoliques ou neutres dont le pH optimum est neutre ou légèrement alcalin (pH 6,8 – 8,0), (2) les invertases vacuolaires et (3) les invertases pariétales, extracellulaires. Les formes vacuolaires et pariétales présentent

un pH optimum acide (pH 4,0 – 5,5). Le rôle des invertases vacuolaires semble primordial dans les premières phases de croissance de la plante et plusieurs fonctions ont été proposées (Figure 7) : rôle dans la fourniture d'énergie à la cellule via la glycolyse, rôle dans l'ajustement osmotique et dans l'expansion tissulaire, et rôle de molécule signal (Sturm & Tang, 1999). Les invertases pariétales joueraient un rôle dans le contrôle de la répartition des assimilats en régulant le chargement phloémien apoplastique (Godt & Roitsch, 1997 ; Roitsch, 1999). Les invertases neutres sont beaucoup moins étudiées que les deux autres formes et sont donc encore assez mal connues. Des études récentes ont pu montrer la présence, au niveau des feuilles, de ces enzymes au sein des chloroplastes (*Oryza sativa* L., Murayama & Handa, 2007 ; *Arabidopsis thaliana*, Vargas *et al.*, 2008). Elles participeraient ainsi au contrôle de la répartition du carbone entre les chloroplastes et le cytosol.

3-4-3-3. Transport

Le saccharose issu de la photosynthèse est transporté des organes sources (feuilles) aux organes puits par la sève phloémienne. Au niveau cellulaire, le transport du saccharose est assuré par des protéines à douze segments transmembranaires et aux extrémités C- et N-terminales cytoplasmiques. Ces protéines, localisées à la fois dans les organes sources et les organes puits, sont impliquées dans le chargement phloémien, donc dans la répartition du saccharose vers les organes puits. Ces transporteurs catalysent un co-transport H+/saccharose et sont classés en différentes catégories selon leur localisation, leur affinité et leur capacité à transporter le saccharose (pour revue, Sauer, 2007).

3-4-3-4. Implication du saccharose dans le débourrement

Le contenu en saccharose des bourgeons de végétaux ligneux évolue au cours de leur croissance, de façon inverse au contenu en amidon (*Prunus persica* L. Batsch. : Marquat *et al.*, 1999, Aue *et al.*, 2000 ; *Malus domestica* L. Borkh., Brunel, 2001). Ainsi, lors de la levée de dormance et du débourrement, la quantité de saccharose augmente.

Plusieurs travaux se sont intéressés aux activités des enzymes de dégradation du saccharose au cours du débourrement :

- L'activité invertase acide vacuolaire (IAV) est faible dans les organes sources (Kingston-Smith *et al.*, 1998), ce qui est en accord avec un export massif de saccharose vers les organes puits, où l'activité de l'enzyme est importante, notamment chez les jeunes feuilles en croissance (Sokolova *et al.*, 2002), les fruits (Zhang & Wang, 2002) et la tige en élongation (Miyamoto *et al.*, 2000 ; Yun *et al.*, 2002). La fonction de l'enzyme est alors d'hydrolyser le

saccharose pour fournir le carbone et l'énergie nécessaire au maintien de la turgescence cellulaire qui constitue la force motrice de l'expansion cellulaire (Yun *et al.*, 2002). Le bourgeon végétatif en cours de débourrement constitue également un puits fort (Tort, 1996). Il a pu être montré qu'au sein du bourgeon, chez le chêne pédonculé (*Quercus robur* L.), l'activité de l'enzyme suivait les variations de l'activité organogénique du méristème (Parmentier, 1993 ; Le Hir, 2005).

- L'activité invertase acide pariétale (IAP) au sein des organes puits a été démontrée chez plusieurs espèces (*Zea mays*, Cheng *et al.*, 1996 ; *Solanum lycopersicum*, Godt & Roitsch, 1997 ; *Arabidopsis thaliana*, Sherson *et al.*, 2003). Cependant, il n'existe que peu de travaux en rapport avec les bourgeons. Une forte augmentation de l'activité IAP au sien des bourgeons de pêcher a été mesurée à l'approche du débourrement (*Prunus persica* L. Batsch., Maurel *et al.*, 2004a).
- Aucune information concernant l'implication de l'invertase neutre dans le débourrement n'est disponible à ce jour, cette enzyme étant beaucoup moins étudiée que l'IAP et l'IAV du fait des faibles valeurs d'activité et taux d'expression de l'enzyme (Roitsch & Gonzalez, 2004). Sa présence a cependant pu être mise en évidence chez le pêcher (*Prunus persica* L.) au sein des organes puits accumulant le saccharose (Lo Bianco *et al.*, 1999a,b, 2000).
- Très peu d'études portent sur l'implication de la SUSY dans le débourrement. Son rôle dans les mécanismes responsables de l'établissement des forces de puits (Winter & Huber, 2000) suggère une possible activité de l'enzyme lors du débourrement. Chez le chêne pédonculé (*Quercus robur* L.), une augmentation de l'activité de la SUSY est mesurée juste après le débourrement au sein de l'apex (Le Hir *et al.*, 2005).

Chez le rosier, la plupart des études portent sur les fleurs, où les molécules carbonées sont considérées comme le facteur principal de régulation de leur développement et de leur sénescence (Khayat & Zieslin, 1989). Lors de l'ouverture de la fleur, une augmentation de l'activité IAV a pu être mesurée ainsi qu'une augmentation de la quantité de sucres réducteurs au sein des pétales (Sood *et al.*, 2006 ; Yamada *et al.*, 2007).

3-4-4. Les hexoses, glucose et fructose

Le glucose et le fructose sont les premiers glucides formés à partir du cycle de Calvin qui sont par la suite convertis sous forme d'éléments de stockage ou de transport. Le transport de

ces molécules est réalisé par des symporteurs H+/monosaccharide, la plupart localisés au niveau des organes puits (pour revue, Büttner, 2007).

3-4-4-1. Métabolisation des hexoses

Chez les végétaux, la métabolisation du glucose débute par l'action de l'hexokinase (EC 2.7.1.1) ou de la glucokinase (2.7.1.63) qui produisent, respectivement, des hexoses phosphorylés (fructose- et mannose-6-phosphate) ou uniquement du glucose-6-phosphate. Ces deux types d'enzymes interviennent dans la phosphorylation du glucose lors de la première étape du processus de la glycolyse. L'hexokinase est également impliquée dans le mécanisme de « sugar-sensing » où le glucose joue alors le rôle de molécule signal dans la régulation de l'expression de certains gènes (Rolland *et al.*, 2006). Le fructose peut, quant à lui, être catalysé par l'hexokinase et par la fructokinase, spécifique du fructose (*Solanum lycopersicum*, Kanayama *et al.*, 1998). La phosphorylation du fructose en fructose-6-phosphate, puis sa conversion en glucose-6-phosphate, permettent l'entrée de la molécule dans la glycolyse.

3-4-4-2. Implication des hexoses dans le débourrement

Chez le pommier (*Malus domestica* L. Borkh.), une augmentation des sucres solubles au sein des bourgeons est observée lors de la période précédent le débourrement (Brunel, 2001). Chez le chêne pédonculé (*Quercus robur* L.), les teneurs en glucose et fructose au sein de l'apex restent stables au cours du débourrement (Le Hir, 2005). Chez les bourgeons végétatifs de pêcher (*Prunus persica* L. Batsch.), les hexoses, et particulièrement le glucose, pourraient jouer un rôle inducteur du débourrement (Maurel *et al.*, 2004a). Plus précisément, le glucose agirait comme un sucre signal et régulerait l'augmentation de sorbitol, responsable du débourrement des bourgeons de pêcher, en utilisant une voie de transduction du signal dépendante des hexokinases (Maurel *et al*., 2004b).

3-4-5. Le raffinose et le stachyose

Le raffinose et le stachyose sont des glucides formés d'une molécule de saccharose liée respectivement à un ou deux résidus galactosyl. Bien que leurs rôles respectifs soient moins étudiés que les autres sucres, des résultats ont montré leur implication, au sein du bourgeon, lors de la période qui précède le débourrement. En effet, pendant cette période, une augmentation des teneurs en raffinose et en sucres solubles a pu être mesurée chez le peuplier (*Populus trichocarpa x Populus deltoïdes*, Bonicel & Verçosa de Médeiros Raposo, 1990). Chez le pêcher (*Prunus persica* L. Batsch.), les potentiels d'absorption pour le stachyose et le

raffinose augmentent également (Marquat *et al.*, 1999), rendant ces sucres facilement utilisables pour fournir les hexoses nécessaires à la croissance.

4. Rôle de la lumière dans la photomorphogenèse et le débourrement

Pour les plantes, la lumière est sans conteste le paramètre environnemental le plus important puisqu'elle constitue leur plus précieuse source d'énergie : les mécanismes photosynthétiques permettent aux plantes de convertir l'énergie radiative, solaire ou artificielle, en énergie potentielle chimique pour produire la matière organique nécessaire à leur croissance. La lumière est également une grande source d'informations concernant l'environnement local de la plante et notamment la présence d'autres plantes à proximité. Cette capacité à percevoir l'environnement va ainsi leur permettre de moduler leur croissance et leur développement.

4-1. La lumière : définition et mécanismes de perception

Le rayonnement solaire parvenant à la Terre s'étend de 200 à 3000 nm (Figure 8) et recouvre les radiations ultraviolettes (UV-A, UV-B et UV-C < 400 nm), le rayonnement visible (400 – 700 nm) et les rayonnements infrarouges (proche PIR et moyen MIR > 700 nm). Les longueurs d'ondes inférieures à 2500 nm représentent 98,8 % de l'énergie du spectre lumineux (de Berranger *et al.*, 2005).

Le rayonnement visible (entre 400 et 700 nm) est qualifié de rayonnement utile pour la photosynthèse (PAR, Photosynthetically Active Radiation), il est exprimé en nombre de photons de la gamme 400 – 700 nm reçus par unité de surface réceptrice et de temps (µmol de photons.m^{-2}.s^{-1}). Cette partie du spectre solaire est absorbée par les chlorophylles et convertie en énergie potentielle chimique lors de la photosynthèse (Kendrick & Kronenberg, 1994). En dehors de ce processus, d'autres radiations vont être actives sur le développement des plantes. Parmi elles, on retrouve les UV-B (de 280 à 320 nm), le bleu associé aux UV-A (de 350 à 500 nm), le rouge clair (Rc, autour de 660 nm) et le rouge sombre (Rs, autour de 730 nm). Ces radiations sont responsables de nombreuses réponses morphogénétiques des plantes (photomorphogenèse) et contrôlent la germination, l'évitement de l'ombre, la floraison et le

phototropisme (Jiao *et al.*, 2007). Ces mécanismes dépendent de la composition spectrale du rayonnement incident et plus particulièrement de la perception de certaines longueurs d'ondes par l'intermédiaire de photorécepteurs autres que les chlorophylles. Dans ce cas, l'énergie mise en jeu dans la photoperception est très faible puisque la lumière est perçue comme un signal et non comme une source d'énergie (cas du processus photosynthétique). Les différents photorécepteurs impliqués dans ces mécanismes sont décrits dans le paragraphe suivant.

Il existe d'autres pigments capables d'absorber la lumière (flavonoïdes, anthocyanes, bétacyanines, caroténoïdes, phycobilines) mais ils ne participent pas à la photomorphogenèse ou au phototropisme (Kendrick & Kronenberg, 1994). Par conséquent, ils ne seront pas présentés dans ce mémoire.

4-2. Les photorécepteurs de la photomorphogenèse et leurs voies de signalisation

En conditions naturelles, les végétaux sont soumis à des variations très importantes d'éclairement (niveau, direction, durée, composition spectrale) aussi bien au cours de la journée que de l'année et en fonction de leur situation géographique (latitude, altitude…). Acquérir des informations sur l'environnement est crucial pour leur survie. Les plantes ont donc mis en place une série de mécanismes pour détecter constamment les changements d'environnement et pour y répondre de façon appropriée. Elles peuvent ainsi détecter la présence, l'absence, la qualité (longueur d'ondes), l'intensité, la direction et la durée des signaux lumineux (Chen *et al.*, 2004 ; Schäfer & Nagy, 2006 ; Whitelam & Halliday, 2007). Cette perception se fait grâce à différents photorécepteurs. Chez les végétaux, il en existe plusieurs types :

- les **phytochromes** qui absorbent les lumières rouge clair et rouge sombre (Smith, 2000 ; Quail, 2002 ; Wang & Deng, 2004),
- les **cryptochromes** et les **phototropines** qui absorbent la lumière bleue et les UV-A (Cashmore *et al.*, 1999 ; Lin, 2002). Récemment, une nouvelle famille de récepteurs de la lumière bleue a été identifiée chez *Arabidopsis thaliana* : ZTL/FKF1/LPK2 (Imaizumi *et al.*, 2003). Cependant, les données bibliographiques concernant la caractérisation de ces photorécepteurs sont encore limitées.
- un **récepteur des UV-B** encore non identifié (Ulm *et al.*, 2005) et dont le rôle exact dans la photomorphogenèse n'a pas encore été totalement établi.

4-2-1. Les phytochromes

Les phytochromes ont été identifiés chez des cyanobactéries (*Fremyella sp.*, Kehoe & Grossmann, 1996), des algues vertes (*Mesotaenium sp.*, Lagarias *et al.*, 1995) et des végétaux supérieurs comme le maïs (*Zea mays*, Christensen & Quail, 1989), la tomate (*Solanum lycopersicum*, Hauser *et al.*, 1995) ou encore le riz (*Oryza sativa* L., Mathews & Sharrock, 1996). De nombreux travaux portent sur leur caractérisation et leur mode de fonctionnement.

4-2-1-1. Structure des phytochromes

Les phytochromes sont des chromoprotéines solubles dimériques. Chaque monomère est un polypeptide d'environ 125 kDa possédant un chromophore lié de façon covalente (Figure 9). Ils existent sous deux formes inter-convertibles : la forme Pr inactive qui absorbe la lumière rouge clair (Rc, maximum d'absorption autour de 660 nm) et la forme Pfr active qui absorbe la lumière rouge sombre (Rs, maximum d'absorption autour de 730 nm) (Rockwell *et al.*, 2006). Les spectres d'absorption des deux formes sont représentés Figure 10A. La transformation réversible entre les deux formes est fondamentale pour la fonction biologique des phytochromes, agissant comme un interrupteur pour favoriser ou réguler les réponses induites par les phytochromes (Kendrick & Kronenberg, 1994).

Chez *Arabidopsis thaliana*, les phytochromes sont codés par une petite famille de cinq gènes, *PHYA à PHYE* (Sharrock & Quail, 1989). La protéine PHYA est labile à la lumière alors que les protéines PHYB à PHYE sont plus stables (Hirschfeld *et al.*, 1998 ; Hennig *et al.*, 1999a). Des études réalisées sur des mutants d'un ou plusieurs phytochromes ont permis de montrer que les phytochromes entrainaient des réponses morphogéniques telles que la germination, le dé-étiolement, l'évitement de l'ombre et la floraison (Quail, 1998 ; Schäfer & Nagy, 2006 ; Whitelam & Halliday, 2007).

Parmi les phytochromes, PHYA et PHYB semblent avoir des fonctions prépondérantes : PHYA est le seul responsable du dé-étiolement de l'hypocotyle observé en réponse à une lumière rouge sombre continue (Nagatani *et al.*, 1993 ; Whitelam *et al.*, 1993) et PHYB est le phytochrome principal permettant la régulation de la croissance de l'hypocotyle sous une lumière rouge clair continue (Somers *et al.*, 1991 ; Reed *et al.*, 1993). Le phytochrome C est un faible senseur de lumière rouge clair avec un rôle dans le dé-étiolement sous cette qualité lumineuse, en complément du rôle de PHYB (Franklin *et al.*, 2003 ; Monte *et al.*, 2003). Les phytochromes D et E sont redondants avec le phytochrome B dans le contrôle de plusieurs

réponses physiologiques liées à l'évitement de l'ombre (Aukerman *et al.*, 1997 ; Devlin *et al.*, 1998).

4-2-1-2. Voies de signalisation des phytochromes

De nombreux travaux ont été et sont toujours menés pour comprendre le mécanisme de transduction de l'information perçue par les phytochromes.

Il a été montré que les phytochromes, présents sous la forme Pr dans le cytoplasme, migraient dans le noyau suite à la conversion par la lumière en forme Pfr (Nagatani, 2004). La localisation nucléaire des phytochromes entraine alors une cascade de signalisation aboutissant, en quelques minutes, à des modifications de l'expression de gènes cibles et par conséquent à des réponses biologiques (Quail, 2002 ; Jiao *et al.*, 2007). Chez *Arabidopsis thaliana*, des analyses par puces à ADN ont révélé que les phytochromes régulaient l'expression de plus de 10 % des gènes, en réponse à des lumières rouge clair ou rouge sombre continues (Tepperman *et al.*, 2001, 2004).

Les membres d'une famille de facteurs de transcription nucléaires possédant un domaine bHLH (basic helix-loop-helix) jouent un rôle central dans la transduction du signal induite par les phytochromes (Duek & Fankhauser, 2005). PIF3 (Phytochrome-Interacting Factor 3) a été le premier membre de cette famille dont l'interaction avec PHYA et PHYB a pu être montrée (Ni *et al.*, 1998). Il est co-localisé dans le noyau avec la forme active du phytochrome (Bauer *et al.*, 2004) et se lie spécifiquement à un élément cis-régulateur (G-box) présent dans les promoteurs de nombreux gènes de réponse à l'obscurité (skotomorphogenèse), induisant ainsi leur transcription (Martinez-Garcia *et al.*, 2000). Chez *Arabidopsis thaliana*, la famille des facteurs de transcription de type bHLH est composée de plus de 160 membres (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). En se basant sur le domaine bHLH, il a pu être établi que PIF3 appartenait à une sous famille de 15 membres (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). Six de ces facteurs (PIF1/PIL5, PIF4, PIF5/PIL6, PIL1, HFR1 et SPT) ont également été mis en évidence dans la voie de signalisation du phytochrome (Duek & Fankhauser, 2005 ; Penfield *et al.*, 2005). Parmi eux, HFR1 (long Hypocotyl in Far-Red 1) et PIL1 (PIF3-Like Factor 1) n'interagissent pas directement avec les phytochromes alors que PIF1, PIF4 et PIF5 interagissent de façon préférentielle avec la forme Pfr du phytochrome, tout comme PIF3 (Khanna *et al.*, 2004 ; Monte *et al.*, 2007). Récemment, un lien entre les voies de signalisation de la lumière et des gibbérellines, hormones intervenant dans la régulation de la croissance cellulaire (Golovatskaya, 2008), a pu être identifié chez *Arabidopsis thaliana* (de Lucas *et al.*, 2008). Ce lien fait intervenir le facteur de transcription PIF4 (PHYTOCHROME INTERACTING

FACTOR 4). Ce facteur est à la fois inhibé en présence de lumière suite à l'activation de PHYB (Quail, 2002) et activé suite à la dégradation des protéines DELLA par la présence des gibbérellines (Sun & Gubler, 2004).

Des résultats récents indiquent que l'interaction PHY-PIF3 *in vivo* entraine une rapide (2 à 5 minutes) phosphorylation de PIF3, nécessaire à la dégradation par le protéasome (Al-Sady *et al.*, 2006). Shen *et al.* (2007) ont observé une phosphorylation et une dégradation similaire lors de l'étude de PIF5. Ceci suggère que la phosphorylation de ces facteurs constitue le signal de dégradation par le protéasome, empêchant ainsi l'association de ces facteurs avec leurs gènes cibles et donc leur activation (Figure 11). L'identité de la kinase responsable de cette phosphorylation est encore inconnue.

4-2-1-3. Implication des phytochromes selon l'intensité lumineuse

Au-delà d'une sensibilité commune aux longueurs d'ondes spécifiques du phytochrome, les différentes formes de phytochromes (PHY A – PHY E) se distinguent par leur réponse à différentes intensités lumineuses. Ainsi, la grande variabilité des signaux lumineux que peuvent percevoir les phytochromes entraine trois modes d'action différents (Casal *et al.*, 1998 ; Josse *et al.*, 2008) :

- les réponses de type VLFR (Very Low Fluence Response), permises par PHYA suite à la perception de radiations de faible intensité (de l'ordre de 10^{-10} à 10^{-7} mol.m^{-2}, Batschauer, 1999) et dont les longueurs d'ondes sont comprises entre 300 et 780 nm,
- les réponses de type LFR (Low Fluence Response), permises par PHYB-E, sont photoréversibles et induites par des intensités lumineuses comprises entre 10^{-6} et 10^{-3} mol.m^{-2} (Batschauer, 1999),
- les réponses de type HIR (High Irradiance Response), permises par PHYA lors d'une exposition prolongée sous une lumière rouge clair ou rouge sombre.

Ainsi, les phytochromes permettent une réponse adaptée aux différentes intensités lumineuses perçues par les plantes et semblent agir en synergie les uns avec les autres dans la régulation de ces réponses. Néanmoins, ces classifications basées sur des réponses physiologiques sont de moins en moins utilisées. En effet, les nombreux mutants des photorécepteurs que nous avons à notre disposition nous permettent dorénavant d'identifier le ou les photorécepteurs impliqués dans le mécanisme étudié.

4-2-1-4. Perception de la lumière bleue par les phytochromes

Un autre processus, beaucoup moins étudié, est celui de la perception de la lumière bleue par les deux formes de phytochromes. L'étude des spectres d'absorption des formes Pr et Pfr (Figure 10A) montre qu'il existe un pic commun aux deux formes à 280 nm (dans l'UV) et aussi deux autres pics différenciés, mais de moindre importance, dans le bleu (à 380 nm pour Pr et à 410 nm pour Pfr). Il a été montré que la lumière bleue pouvait activer les phytochromes (Lin, 2002) et il a longtemps été suspecté que ces derniers pouvaient également fonctionner comme des récepteurs de la lumière bleue (Kendrick & Kronenberg, 1994). C'est notamment le cas de PHYA (Neff & Chory, 1998) qui, sous lumière bleue, participe à l'inhibition de la croissance de l'hypocotyle, l'ouverture et l'expansion des cotylédons et à la régulation de l'horloge circadienne (Neff & Chory, 1998 ; Somers *et al.*, 1998). Plus récemment, il a été montré que, lorsque les racines d'*Arabidopsis thaliana* étaient éclairées par une lumière bleue, PHYA et/ou PHYB étaient absolument nécessaires, en association avec CRY1, pour permettre l'augmentation des taux de chlorophylle au sein des racines (Usami *et al.*, 2004). En effet, que ce soit chez le mutant *cry1* ou chez le double mutant *phyAphyB*, aucune augmentation des taux de chlorophylle n'est enregistrée.

4-2-2. Les cryptochromes

Les cryptochromes perçoivent la lumière bleue et les UV-A. Ils ont été découverts chez *Arabidopsis thaliana* et *Sinapis alba* en 1993 (Ahmad & Cashmore, 1993 ; Batschauer, 1993). Puis ils ont été identifiés chez de nombreuses autres espèces végétales, des bactéries, des champignons, des animaux et chez l'Homme. Les cryptochromes peuvent être ainsi considérés comme la famille de photorécepteurs la plus largement représentée dans le monde vivant. Depuis leur découverte, une large quantité de données sur leurs fonctions biologiques, leurs voies de signalisation et leur structure ont été accumulées (Lin & Shalitin, 2003 ; Banerjee & Batschauer, 2005 ; Partch & Sancar, 2005). Ils permettent la régulation de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la photomorphogenèse et la régulation de l'horloge circadienne (Lin & Todo, 2005).

4-2-2-1. Structure des cryptochromes

Les cryptochromes sont des protéines d'environ 75 kDa composées de deux domaines (Figure 9) : (1) la région N terminale (domaine PHR), semblable à une photolyase (Sancar, 2003), permettant la liaison de deux chromophores une flavine adénine dinucléotide (FAD) et

une ptérine (5,10-methenyltetrahydrofolate ou MTHF), et (2) la région C terminale, dont la taille peut varier.

Le spectre d'absorption de la flavine, chromophore des cryptochromes, est présenté Figure 10B. Les pics d'activité des photorécepteurs étant relativement peu prononcés dans cette gamme de longueurs d'onde, le rayonnement actif est caractérisé par l'ensemble de la bande spectrale située entre 320 et 520 nm. Contrairement aux phytochromes qui perçoivent la lumière rouge et la lumière bleue, les cryptochromes n'absorbent pas la lumière rouge (Lin *et al.*, 1995).

La plupart des plantes semblent posséder plus d'un cryptochrome. *Arabidopsis thaliana* présente deux cryptochromes clairement identifiés, CRY1 et CRY2 (Ahmad & Cashmore, 1993 ; Hoffman *et al.*, 1996 ; Lin *et al.*, 1996), et un troisième (CRY3 ou AtcryDASH, 60,7 kDa au lieu de 75 kDa pour CRY1 et CRY2)[1] pour lequel la fonction biologique n'est pas encore clairement établie (Kleine *et al.*, 2003 ; Brudler *et al.*, 2003). La tomate et le riz possèdent trois cryptochromes (*Solanum lycopersicum*, Perrotta *et al.*, 2000 ; *Oryza sativa* L., Matsumoto *et al.*, 2003). Chez la tomate (*Solanum lycopersicum*), un quatrième cryptochrome de type cryDASH existerait (G. Giuliano, non publié, reporté par Whitelam & Halliday, 2007).

4-2-2-2. Voies de signalisation des cryptochromes

A l'obscurité, les protéines CRY1 et CRY2 sont situées dans le noyau. La lumière bleue provoque une rapide phosphorylation, nécessaire à leur activité biologique (Shalitin *et al.*, 2002, 2003). Bien que la transduction du signal lumineux par les cryptochromes n'ait pas encore été totalement élucidée, il semble que le déclenchement de la voie de signalisation serait dû à un changement de conformation de la protéine : l'extrémité C terminale du cryptochrome pourrait alors interagir avec d'autres protéines telles que COP1, un répresseur majeur de la photomorphogenèse (Lin & Shalitin, 2003). COP1 agit comme une ubiquitine-ligase et participe à la dégradation de plusieurs facteurs favorisant la photomorphogenèse comme HY5, HYH, LAF1 et HFR1 (Ang *et al.*, 1998 ; Osterlund *et al.*, 2000 ; Holm *et al.*, 2002 ; Yang *et al.*, 2005).

4-2-3. Les phototropines

Mises en évidence chez *Arabidopsis thaliana* (Liscum & Briggs, 1995 ; Huala *et al.*, 1997), les phototropines interviennent dans plusieurs processus, notamment le phototropisme

[1] Les protéines de type cryDASH ne possèdent que le domaine photolyase du cryptochrome et leur fonction est toujours inconnue (Lin & Todo, 2005).

(Briggs & Christie, 2002), les mouvements chloroplastiques (Kagawa *et al.*, 2001), l'ouverture des stomates (Kinoshita *et al.*, 2001) et l'expansion foliaire (Sakamoto & Briggs, 2002). Leur rôle dans la photomorphogenèse n'a jamais été réellement démontré mais quelques études laissent penser qu'elles participent à ce processus, et notamment à l'expansion des cotylédons (Folta & Spalding, 2001 ; Ohgishi *et al.*, 2004).

Il existe deux phototropines chez *Arabidopsis thaliana* : PHOT1 et PHOT2. Ce sont des protéines de 120 kDa constituées de deux domaines LOV (Light Oxygen Voltage) en position N terminale et d'un domaine serine/thréonine kinase à l'extrémité C terminale (Figure 9). A l'obscurité, chaque domaine LOV lie de façon non covalente un chromophore FMN (Flavin MonoNucleotide). Après irradiation par la lumière bleue, un changement de conformation permet l'autophosphorylation de la protéine et déclenche la cascade de signalisation (Briggs & Christie, 2002 ; Salomon *et al.*, 2003). Celle-ci fait intervenir deux protéines, NPH3 et RPT2, qui peuvent se lier à PHOT1 (Motchoulski & Liscum, 1999 ; Inada *et al.*, 2004) pour former un complexe qui interviendrait dans la régulation du phototropisme (Esmon *et al.*, 2006).

4-2-4. Points communs aux différentes voies de signalisation des photorécepteurs

De nombreux travaux portent sur l'approfondissement des voies de signalisation des différents photorécepteurs (Figure 12). Il en ressort qu'il existe des points de convergence entre les différentes cascades de signalisation, ce qui laisse entrevoir la grande complexité de la transduction du signal lumineux chez les végétaux (Gyula *et al.*, 2003).

4-2-4-1. Phytochromes et cryptochromes

Le facteur de transcription PIF3 intervient dans la cascade de signalisation des phytochromes (Ni *et al.*, 1999) et peut se lier à d'autres facteurs de transcription, notamment HFR1 (Fairchild *et al.*, 2000). Il a été montré que HFR1 participait également à la voie de transduction du signal par CRY1 (Duek & Fankhauser, 2003).

Des interactions physiques entre les phytochromes et les cryptochromes ont également été reportées : PHYA et CRY1 peuvent se lier par leurs domaines C terminaux (Ahmad *et al.*, 1998). En ce qui concerne PHYB, aucune interaction avec CRY1 n'a pu être démontrée mais il est intéressant de noter que CRY1 et l'extrémité C terminale de PHYB peuvent se lier avec COP1 et ZTL (Jarillo *et al.*, 2001 ; Yang *et al.*, 2001).

4-2-4-2. Phytochromes et phototropines

Récemment, les résultats de Lariguet *et al.* (2006) ont pu montrer que les phytochromes jouaient également un rôle dans le phototropisme. La protéine PKS1 (Phytochrome Kinase Substrate 1), un élément de la cascade de signalisation de PHYA (Fankhauser *et al.*, 1999), est localisée dans la membrane plasmique et peut former un complexe avec PHOT1 et NPH3. Ainsi, les protéines PKS représentent un lien entre les voies de signalisation des phytochromes et des phototropines.

4-2-4-3. Cryptochromes et phototropines

Plusieurs résultats laissent penser que chacun de ces photorécepteurs participent à la fois à la photomorphogenèse et au phototropisme (Folta & Spalding, 2001 ; Ohgishi *et al.*, 2004; Mao *et al.*, 2005 ; Kang *et al.*, 2008). Cependant, à l'heure actuelle, le ou les points de convergence entre les deux voies de signalisation n'ont pu être identifiés (Kang *et al.*, 2008).

4-3. Effet de la lumière sur l'architecture et le débourrement

Les effets de l'intensité et de la qualité lumineuse sur le débourrement des bourgeons, la croissance et l'orientation des tiges ont été étudiés chez plusieurs espèces, et certains résultats ont été obtenus chez le rosier. A ces travaux s'ajoutent les données obtenues dans le cadre de l'étude de l'évitement de l'ombre, processus dû aux changements de qualité et d'intensité lumineuse provoqués par la présence de plantes à proximité (Neff *et al.*, 2000). Un récapitulatif des travaux répertoriés ici est présenté dans le Tableau II.

4-3-1. Effet de l'intensité lumineuse

Chez plusieurs espèces, la ramification est favorisée par de fortes intensités lumineuses. C'est ce qui est observé chez l'airelle (*Vaccinium bracteatum* et *Vaccinium hirtum,* Kawamura & Takeda, 2002, 2004), ainsi que chez différentes espèces (*Litsea acuminata*, Takenaka, 2000 ; le sapin baumier (*Abies balsamea* L.), l'épicéa (*Picea abies* L.) et le pin sylvestre (*Pinus sylvestris*), Niinemets & Lukjanova, 2003). Au contraire, des intensités lumineuses faibles entraînent une diminution de la ramification chez le frêne de Pennsylvanie (*Fraxinus pennsylvanica*, Bartlett & Remphrey, 1998), principalement en diminuant le nombre et la longueur des tiges.

L'influence de l'intensité lumineuse sur le tallage de plusieurs monocotylédones a également été étudiée : chez le blé (*Triticum aestivum*, Evers *et al*., 2006) et le ray-grass

anglais (*Lolium perenne* L., Bahmani *et al*., 2000), les bourgeons restent dormants lorsque l'intensité lumineuse est faible.

Chez le rosier, la majorité des travaux concernant l'influence de la lumière, que ce soit l'intensité ou la qualité, ont été réalisés sur des rosiers destinés à la production de fleurs coupées, ces travaux ayant pour but d'améliorer la quantité et la qualité de tiges florales produites. Les travaux de Khayat & Zieslin (1982) sont particulièrement intéressants puisqu'ils montrent que les bourgeons basaux de la tige, une fois la dominance apicale levée, par décapitation de la partie distale de la tige, ont un besoin absolu de lumière pour débourrer alors que les bourgeons en position plus distale débourrent même à l'obscurité. Le débourrement des bourgeons axillaires basaux semble donc être un mécanisme fortement sous photocontrôle. Cependant, les travaux sur la réponse même du bourgeon de rosier à la lumière sont peu nombreux. Bredmose (1997) a montré que les fortes intensités lumineuses accéléraient le débourrement (une diminution du temps entre bouturage et débourrement du bourgeon de la bouture) et augmentaient légèrement le pourcentage de bourgeons débourrés. Ces travaux ont également mis en évidence l'impact de la lumière sur la croissance des rameaux chez le rosier : les fortes intensités lumineuses accélèrent la vitesse de croissance du rameau après le débourrement (Bredmose, 1997), augmente le diamètre des tiges et l'accumulation de matières sèches (Bredmose, 1998 ; Kim & Lee, 2002). On note également la formation de tiges plus courtes et une diminution du nombre de feuilles à cinq folioles (Bredmose, 1998).

4-3-2. Effet de la qualité lumineuse

L'effet de la qualité lumineuse sur le débourrement et l'architecture concerne principalement l'étude de l'impact de la lumière rouge. Chez le disanthus à feuilles de cercis (*Disanthus cercidifolius*), l'aubépine (*Crataegus oxyacantha*) et différents cultivars de rhododendrons (*Rhododendron sp.*), la lumière rouge clair stimule le débourrement des bourgeons axillaires et l'élongation des tiges (Marks & Simpson, 1999). Chez le prunier (*Prunus cerasifera*), l'effet contraire est observé : la lumière rouge clair provoque une diminution du taux de débourrement des bourgeons axillaires (Muleo *et al*., 2001). Chez le bouleau (*Betula pubescens* L.), le saule (*Salix pentandra* L.), l'épicéa (*Picea abies* L.) et le pin sylvestre (*Pinus sylvestris* L.), la présence de rouge lointain est nécessaire pour maintenir la croissance des axes caulinaires (Clapham *et al.*, 1998, 2002).

Chez les monocotylédones, le ratio lumière rouge clair/lumière rouge sombre (Rc/Rs) a également un impact sur la ramification : celle-ci est réduite chez le ray-grass d'Italie (*Lolium*

multiflorum), la paspale dilatée (*Paspalum dilatatum*) (Casal *et al*., 1985, 1986), l'orge (*Hordeum vulgare*, Skinner & Simmons, 1993) et une graminée (*Eragrostis curvula*, Wan & Sosebee, 1998) lorsque le ratio Rc/Rs est faible. Un résultat similaire a été observé chez une dicotylédone : le trèfle blanc (*Trifolium repens* L., Robin *et al.*, 1994).

Quelques travaux ont porté sur l'impact de la lumière bleue. Chez le sapin (*Picea abies* L.), la lumière bleue ne permet pas le maintien de la croissance des tiges alors qu'elle est favorisée par la lumière rouge (Molmann *et al*., 2006). Chez le ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.), la lumière bleue ne semble pas impliquée dans la régulation du tallage (Gautier *et al*., 1999). Au contraire, elle permet le débourrement des bourgeons axillaires chez le prunier (*Prunus cerasifera*, Muleo *et al*., 2001) et le tallage chez le blé (*Triticum aestivum*, Barnes & Bugbee, 1992). Chez des jeunes tiges de pommier (*Malus domestica*) cultivées *in vitro*, la lumière bleue favorise la croissance mais celle-ci est moins importante que sous lumière rouge : la ramification est alors moins importante et les entre-nœuds sont plus courts (Muleo & Morini, 2006, 2008). On note une observation similaire chez le stolon du trèfle blanc (*Trifolium repens* L.) : celui-ci est plus court lorsque la lumière bleue est réduite (Gautier *et al.*, 1998).

Chez le rosier (*Rosa hybrida* L.), le rapport Rc/Rs joue également un rôle prépondérant dans la réponse du débourrement à la lumière. Ainsi, il a été montré que l'utilisation de la lumière fluorescente (ratio Rc/Rs élevé) augmentait le pourcentage de débourrement des bourgeons distaux (Mor *et al.*, 1980 ; Zieslin & Mor, 1990). L'effet contraire est observé lors de l'utilisation d'une lumière incandescente (ratio Rc/Rs faible). La qualité lumineuse influence également la croissance des tiges : un mélange de lumière fluorescente et de lumière incandescente entraine une augmentation significative de la vitesse de croissance de la tige par rapport à la lumière fluorescente seule (Mor *et al.*, 1980). L'effet inhibiteur de la lumière rouge sombre sur le débourrement a également été mis en évidence chez le rosier par Healy & Wilkins (1980). Aucune étude concernant l'impact de la lumière bleue n'a été réalisée chez le rosier.

4-4. Effet de la lumière sur les composantes physiologiques du débourrement

Comme nous l'avons vu précédemment, le débourrement des bourgeons fait intervenir plusieurs processus physiologiques, notamment le flux d'eau et l'apport de sucres permettant la croissance. Plusieurs travaux montrent que la lumière agit directement sur ces mécanismes pour réguler la croissance des plantes.

4-4-1. Influence sur les flux hydriques

L'eau est un élément nécessaire à la croissance des cellules (Zeuthen, 2001). Son transport à travers la plante est en partie régulé par la lumière. En effet, ce facteur environnemental va contrôler l'ouverture des stomates pour moduler la transpiration foliaire (Sack *et al*., 2002) et va également avoir un impact sur la conductivité hydraulique (Tyree *et al*., 2005).

La circulation de l'eau de cellule en cellule est facilitée par les aquaporines, des protéines transmembranaires (pour revue, Maurel, 2008). Les travaux menés dans le cadre de l'étude de la conductivité hydraulique foliaire ont pu mettre en évidence l'impact de la lumière sur ces protéines (*Juglans regia* L., Cochard *et al*., 2007) : l'expression des gènes *JrPIP2,1* et *JrPIP2,2*, codant des aquaporines, est stimulée par la lumière. Cet effet est réversible puisqu'un retour à l'obscurité entraîne une diminution à un niveau basal de l'expression génique.

Il n'existe que peu de travaux portant sur les aquaporines et les bourgeons. Récemment, Yooyongwech *et al.* (2008) ont pu mettre en évidence l'implication de deux aquaporines dans la levée d'endormance chez les bourgeons de pêcher (*Prunus persica* L.) : l'expression génique de *PpTIP1* et *PpPIP2*, deux gènes codant des aquaporines, est fortement stimulée lors de la levée d'endodormance. Néanmoins, aucune étude n'a pu montrer, au sein du bourgeon, l'impact de la lumière sur l'expression génique des aquaporines.

4-4-2. Influence sur le métabolisme glucidique

Pour plusieurs auteurs (Mor & Halevy, 1984 ; Maas & Bakx, 1995), le rapport Rc/Rs agirait, chez le rosier, sur les relations source/puits et la répartition des assimilats. Des travaux menés chez le rosier ont mis en évidence que la lumière rouge clair favorisait le transport des sucres vers l'apex en croissance en augmentant sa force de puits alors que le rouge lointain ne serait pas capable, seul, de stimuler cette translocation (Mor & Halevy, 1980 ; Mor *et al*., 1980).

Des mesures des contenus glucidiques réalisés chez plusieurs espèces sous différentes conditions d'éclairement ont été réalisées. C'est principalement l'impact de la variation de l'intensité lumineuse qui a été étudié. Chez le nectarinier (*Prunus persica* L. var. *nectarina*), la diminution de l'intensité lumineuse entraîne une diminution de la teneur en saccharose au niveau des feuilles (Wang *et al*., 2005). Au sein d'un organe puits comme le fruit du caféier (*Coffea arabica* L.), la diminution de l'intensité lumineuse entraîne une diminution de la

concentration en saccharose, ainsi qu'une augmentation de la quantité de sucres réducteurs (Geromel *et al.*, 2008).

Les activités des enzymes liés à la dégradation du saccharose montrent, pour certaines, une régulation par l'intensité lumineuse. Sous une faible intensité lumineuse, la SUSY présente une activité plus faible chez les feuilles de nectarinier (*Prunus persica* L. var. *nectarina*, Wang *et al*., 2005) et, au contraire, plus forte chez les drupes du caféier (*Coffea arabica* L., Geromel *et al.*, 2008). Chez le tubercule de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.), l'activité IAV est réduite sous une faible intensité lumineuse, alors que l'activité IAP reste inchangée (Chen & Setter, 2003).

Au niveau génique, les enzymes liées à la dégradation de l'amidon semblent faire l'objet d'une régulation par la lumière. Ainsi, l'analyse du promoteur d'un gène codant une α-amylase de riz (*Oryza sativa* L.) a mis en évidence la présence d'une séquence de type Gbox, un élément de réponse à la lumière, suggérant que le gène pourrait être soumis à un contrôle exercé par la lumière (Lu *et al.*, 1998). Une β-amylase apparait également comme étant un gène très rapidement induit par la lumière rouge clair au sein de l'hypocotyle chez *Arabidopsis thaliana* (Tepperman *et al.*, 2004).

4-4-3. Régulation de la croissance cellulaire

La lumière joue un rôle dans la régulation des divisions et des expansions cellulaires. Chez l'hypocotyle de concombre (*Cucumis sativus*), une intensité lumineuse moyenne (de l'ordre de 40 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) favorise l'élongation cellulaire mais pas les divisions cellulaires. Sous des intensités lumineuses plus fortes, les deux processus sont stimulés (Lopez-Juez *et al.*, 1995). L'impact de la lumière sur les protéines intervenant dans ces processus a été étudié chez plusieurs espèces, et notamment celui sur les expansines. Ainsi, deux types de régulation ont pu être distingués. La lumière peut réguler directement l'expression des expansines, protéines impliquées dans la croissance cellulaire. Chez *Arabidopsis thaliana*, des expériences de puces à ADN ayant pour but d'identifier des gènes régulés par la lumière (Ma *et al.*, 2005) ont permis l'identification de l'α-expansine 10, dont le rôle central dans la morphogenèse foliaire a pu être montré (Cho & Cosgrove, 2000). Chez la tomate (*Solanum lycopersicum*), au niveau de l'hypocotyle, l'expression génique des α-expansines *LeEXPA2* et *LeEXPA18* est fortement stimulée en présence de lumière (Caderas *et al.*, 2000). L'analyse, par puce à ADN, des gènes régulés par la lumière au niveau de l'apex et des primordia foliaires d'*Arabidopsis thaliana* a également mis en évidence une stimulation de plusieurs gènes d'expansines (Lopez-Juez *et al.*, 2008) et laisse penser que l'expression génique est sous photocontrôle.

L'analyse de la séquence promotrice du gène *LeEXPA2* révèle la présence d'éléments cis-régulateurs de la réponse à la lumière (*Solanum lycopersicum*, Caderas *et al.*, 2000). L'action de la lumière sur les expansines peut également être indirecte. En entraînant une diminution du pH intracellulaire, associée au pompage de protons dans la matrice extracellulaire (Van Volkenburgh & Cleland, 1980), la lumière régule l'activité des α- et des β-expansines, protéines stimulées par les pH acides (McQueen-Mason *et al.*, 1992 ; Li *et al.*, 2003).

Matériels et Méthodes

1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué principalement de jeunes plants de rosier, mais également d'*Arabidopsis*, de tomate et de peuplier.

1-1. Variétés de rosiers

Six variétés de rosiers de jardin appartenant à trois espèces différentes sont utilisées lors des expérimentations : *Rosa hybrida* 'Radrazz' (Knock out®), *Rosa hybrida* 'Meiprille' (Sangria®), *Rosa hybrida* 'Meichibon' (Tchaïkovski®), *Rosa hybrida* 'Meiratcan' (Lovely Meilland®), *Rosa chinensis* 'Old blush' et *Rosa wichurana* 'Basye's thornless' (Figure 13). Ces six cultivars présentent un port buissonnant, à l'exception de *Rosa wichurana* 'Basye's thornless' qui présente un port rampant.

1-1-1. Modalités de culture

Des boutures « simple nœud » sont réalisées à partir de tiges de pieds-mères (un seul génotype par variété) cultivés en serre. Les nœuds portant des feuilles à cinq ou sept folioles sur la partie médiane des tiges sont prélevés et placés dans des mottes FERTISS (FERTIL). L'enracinement a lieu après quatre à cinq semaines de culture sous un fort degré hygrométrique.

Les boutures enracinées sont transférées dans des pots de 500 mL contenant un mélange de tourbe, de fibres de coco et de perlite (70%/20%/10%, v/v/v) et placées en serre à 25°C ± 5°C. Un éclairage additionnel est délivré par des lampes à vapeur de sodium haute pression lorsque le rayonnement solaire global est inférieur à 200 W/m².

1-1-2. Description de la plante expérimentale et du prélèvement du matériel végétal

Pour *Rosa hybrida* 'Radrazz' et *Rosa chinensis* 'Old blush', lorsque le bouton floral est visible à environ 0,5 cm au dessus de la feuille terminale, les plantes sont décapitées 0,5 cm au dessus de la 3ème feuille à cinq folioles basale. Pour *Rosa hybrida* 'Meiprille', 'Meichibon' et 'Meiratcan', caractérisées par un développement végétatif plus long, et pour *Rosa wichurana* 'Basye's thornless', qui ne fleurit pas sous nos conditions de culture en serre, les plantes sont décapitées 0,5 cm au dessus de la 3ème feuille à cinq folioles basale lorsque sept à huit feuilles foliolées sont épanouies le long de la tige. Puisque le développement des bourgeons est corrélé avec les feuilles, et notamment la surface de ces dernières (Le Hir *et al*., 2006), les feuilles sont enlevées juste après la décapitation afin d'homogénéiser le matériel

végétal utilisé (Figure 14). Le débourrement des 3 bourgeons restants le long de la tige, appelés respectivement bourgeon distal, médian et proximal, est étudié.

Pour les expérimentations de biologie moléculaire et de biochimie, les bourgeons distaux des plantes expérimentales sont prélevés et placés dans l'azote liquide, puis conservés à -80°C. Dans certains cas, les nœuds portant ces bourgeons sont également prélevés (Figure 15). Pour les plantes placées à l'obscurité, les prélèvements sont réalisés rapidement en présence de lumière verte.

Afin de limiter les variations dues aux rythmes circadiens, les décapitations sont toujours réalisées entre 10h et 12h.

1-1-3. Caractérisation visuelle du débourrement

La caractérisation du débourrement est basée sur la croissance des primordia foliaires hors des écailles du bourgeon. Ces écailles, au nombre de quatre, s'écartent pour laisser sortir les jeunes feuilles. Lorsque l'extrémité de la première feuille est visible hors des écailles, alors le bourgeon est considéré comme débourré (Figure 16, 48h).

Dans le cas de notre plante expérimentale placée à la lumière, le bourgeon distal n'est plus soumis à la dominance apicale (suite à la décapitation) et aux inhibitions corrélatives dues aux feuilles (les feuilles axillantes ont été enlevées). Le bourgeon distal est apte à débourrer dès la décapitation. Très rapidement, dès 24 h après décapitation, un gonflement du bourgeon est observé (Figure 16) et les écailles s'écartent. L'allongement du bourgeon se poursuit et, en moyenne 72 h après décapitation, l'extrémité de la première feuille est visible hors des écailles. Quatre jours après décapitation, le bourgeon est débourré (Figure 16, 96h).

1-2. Jeunes plantes d'*Arabidopsis thaliana*, de tomate et de peuplier

La réponse à la lumière du débourrement est étudiée chez trois genres différents: *Arabidopsis thaliana* L. 'Columbia', la tomate (*Solanum lycopersicum* L. 'Tresor' hybrid F1) et le peuplier (*Populus tremula* x *Populus tremuloïdes* L.).

1-2-1. Modalités de culture

Pour *Arabidopsis thaliana*, les plantes sont obtenues après germination des graines dans des mini-mottes de tourbe et cultivées en présence de lumière blanche (200 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, 16h/24h). Pour la tomate, des graines sont mises à germer dans des pots contenants de la

tourbe et sont cultivées en serre. Les peupliers sont obtenus à partir de vitro-plants acclimatés en serre (fourni par G. Pilate, INRA Orléans) et cultivés en pots contenant de la tourbe.

1-2-2. Plantes expérimentales

Les hampes florales des plantes d'*Arabidopsis thaliana* sont décapitées et les débourrements des bourgeons situés à l'aisselle des feuilles de rosette sont étudiés. Pour les tomates et les peupliers, les tiges sont coupées dans leur partie basale et toutes les feuilles sont enlevées ; le débourrement des bourgeons basaux est suivi.

2. Traitements lumineux

Après décapitation, les plantes sont placées dans une enceinte de culture (modèle KBW720 avec régulation de l'intensité lumineuse, Binder) et soumises à différents traitements lumineux, en maintenant la température constante à 23°C.

La lumière blanche (2, 20 et 200 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) est produite par des tubes fluorescents Osram Fluora L 18W/77, la lumière bleue (20 et 200 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) par des tubes fluorescents Philips TL-D 18W/18 et la lumière rouge clair (Rc, 20 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) par des tubes fluorescents Philips TL-D 18W/15. Il est à noter que ces derniers ne peuvent fournir une lumière rouge clair ayant une intensité supérieure à 20 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$. La lumière rouge sombre (Rs, 2,7 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) est obtenue en plaçant des filtres Roscolux rouge (#27) et bleu (#83) sur des tubes fluorescents Osram Fluora L 18W/77 (lumière blanche).

Les distributions spectrales et les flux de photons des différentes sources lumineuses sont mesurés avec un spectroradiomètre calibré UV/VIS (RAMSES, Trios GmbH). Les distributions spectrales sont présentées Figure 17. Les pourcentages de lumière rouge clair et de lumière bleue des sources lumineuses blanches, rouge clair et bleue sont présentées Figure 18. Les ratios Rc/Rs sont mesurés et sont les suivants : 4,39 pour la lumière blanche, 0,78 pour la lumière bleue, 20,27 pour la lumière Rc et 0,25 pour la lumière Rs.

Les plantes mises en condition d'obscurité sont recouvertes d'un sac plastique opaque. Une expérience préliminaire réalisée avec un sac plastique transparent a démontré que la présence du sac n'empêchait pas le débourrement des bourgeons des plantes expérimentales : un débourrement identique en terme de fréquence et de durée est obtenu avec ou sans un sac transparent.

Une lumière verte (3,6 µmol.m^{-2}.s^{-1}) est utilisée lors des prélèvements des bourgeons distaux des plantes placées à l'obscurité. Cette lumière est fournie par une ampoule à iodures métalliques de couleur verte (Artcolour MH-T Pro 400W Green E4N SLV, Philips) recouverte de trois épaisseurs de filtre Roscolux vert (#90) ; la distribution spectrale est présentée Figure 17.

Pour toutes les expériences, sauf mention contraire, les plantes ont été soumises à une photopériode 16h/24h (avec une période d'éclairement quotidienne réglée de 7h à 23h).

3. Etude morphologique du débourrement

3-1. Evaluation du débourrement et de la croissance foliaire

Le débourrement et la croissance des feuilles hors des bourgeons sont évalués 12 jours après décapitation, chez les six variétés de rosiers étudiées. Selon les conditions lumineuses appliquées pendant les 12 jours de culture, les bourgeons débourrés présentent soit (i) plusieurs feuilles épanouies hors des écailles, (ii) l'extrémité de la première feuille sortant des écailles. Les bourgeons dont seule l'extrémité de la première feuille est visible hors des écailles sont considérés comme des bourgeons débourrés.

Le nombre de feuilles visibles hors des bourgeons est compté après 12 jours de culture sous des conditions lumineuses différentes. Une note de 0,5 a été attribuée aux bourgeons dont seule l'extrémité de la première feuille est visible hors des écailles. Une note de 1, 2 ou 3 est donnée aux bourgeons débourrés présentant respectivement 1, 2 ou 3 feuilles totalement épanouies hors des écailles.

La croissance des primordia foliaires au sein du bourgeon est étudiée au cours du temps (0, 24, 48, 72, 96 h après décapitation) en conditions de lumière et d'obscurité, chez *Rosa hybrida* 'Radrazz'. Les quatre premières pièces foliaires, correspondant à quatre écailles, sont enlevées et les longueurs des trois premières feuilles assimilatrices sont mesurées sous loupe binoculaire, à l'aide d'un oculaire gradué.

3-2. Evaluation de l'activité organogénique au sein du méristème apical

3-2-1. Observation macroscopique

Le nombre de pièces foliaires (écailles, jeunes feuilles préformées et primordia foliaires) dans les bourgeons distaux est déterminé pour trois variétés, *Rosa wichurana* 'Basye's thornless', *Rosa hybrida* 'Radrazz' et 'Meiprille', 7 jours après décapitation, sous différentes conditions lumineuses. Chaque bourgeon distal est disséqué sous loupe binoculaire, les pièces foliaires sont enlevées et comptées jusqu'à ce que le méristème apical soit totalement mis à nu.

3-2-2. Analyse histologique

L'activité organogénique du méristème est également étudiée grâce à des observations histologiques de bourgeons de *Rosa hybrida* 'Radrazz' prélevés 3 jours après décapitation. Les bourgeons sont fixés et inclus en résine Technovit 7100, comme décrit par Le Hir *et al*. (2006). Des coupes transversales de 10 µm sont réalisées au microtome (RM2165, Leica) puis colorées au bleu de toluidine et observées au microscope (Axioskop 2 plus, Zeiss).

3-3. Evaluation de la croissance des cellules des primordia foliaires

Les bourgeons distaux de plantes expérimentales (*Rosa hybrida* 'Radrazz') placées pendant 7 jours à la lumière blanche (200 $\mu mol.m^{-2}.s^{-}1$, 16h/24h) ou à l'obscurité sont prélevés et placés dans une solution de fixation (1 volume de glutaraldéhyde 25% (v/v), 5 volumes de solution tampon (Annexe 1)). Les quatre premières pièces foliaires sont enlevées sous loupe binoculaire puis la première feuille assimilatrice (F1) de chaque bourgeon est placée sous vide pendant 2 h et à température ambiante. Le fixateur est alors remplacé par la solution tampon et les échantillons sont conservés à 4°C. La suite du protocole est effectuée par les personnels du Service Commun d'Imageries et d'Analyses Microscopiques (SCIAM) de la Faculté de Médecine de l'Université d'Angers, afin de préparer les échantillons à l'observation au microscope électronique à balayage. La longueur des quinze cellules les plus grandes dans un champ d'observation (x500) de deux zones de la 1ère feuille assimilatrice sont mesurées.

4. Techniques de biologie moléculaire

4-1. Extraction d'acides nucléiques

4-1-1. Extraction d'ARN totaux à partir de matériel végétal

L'extraction des ARN totaux de rosiers est réalisée sur des bourgeons de *Rosa hybrida* 'Radrazz' prélevés sous différentes conditions d'éclairement, au cours du temps.

Le matériel végétal (~100 µg, soit en moyenne 50 bourgeons) est broyé dans l'azote liquide en présence de PVP40 (10% ; p/p) puis transféré dans un tube Eppendorf de 2 mL. La suite de l'extraction, comprenant un traitement à la DNAse, est réalisée grâce à un kit commercial (NucleoSpin RNA Plant, Macherey-Nagel), selon les conditions définies par le protocole du fournisseur.

Deux fractions aliquotes sont prélevées de façon à estimer d'une part la concentration en ARNtx par spectrophotométrie (DO 260 nm, Nanodrop Technologies), et d'autre part la qualité des ARNtx par migration sur un gel à 1,5% d'agarose. Le gel d'agarose est alors mis en présence d'une solution de bromure d'éthidium (0,5 $\mu g.mL^{-1}$, TAE 0,5X) pendant 15 minutes puis est observé sous lumière UV.

4-1-2. Minipréparation d'ADN plasmidique d'*Escherichia coli*

Les minipréparations d'ADN plasmidique sont réalisées à partir de 3 mL de culture bactérienne suivant le protocole du kit commercial utilisé (NucleoSpin Plasmid, Macherey-Nagel).

4-2. Obtention d'ADN complémentaire

4-2-1. Réaction de Reverse Transcription (RT)

Un µg de chaque préparation d'ARNtx est soumis à la réaction de reverse transcription (RT). Un µg d'ARNtx est dilué dans un volume final de 10 µL puis dénaturés 5 min à 65°C. Cette étape permet d'éliminer les structures secondaires des ARNm qui pourraient gêner la RT. Neuf µL de mélange réactionnel sont alors ajoutés (4 µL de tampon 5X de la Superscript III Reverse Transcriptase (Tris-HCl 250 mM pH 8,3, KCl 375 mM, $MgCl_2$ 15 mM), 1 µL de RNAse inhibiteur (40 $U.\mu L^{-1}$, Promega), 1 µL de DTT 0,1M, 1 µL de dNTP 10 mM, 1 µL

d'oligo$(dT)_{18}$ (0,5 mg.mL^{-1}) et 1 µL d'eau DEPC). Le mélange est ensuite incubé pendant 5 min à température ambiante pour permettre l'accrochage des oligo$(dT)_{18}$ sur les ARN. Puis 1 µL de Superscript III Reverse Transcriptase (200 U.µL^{-1}, Invitrogen) est ajouté au mélange qui est alors incubé pendant 2 h à 45°C. L'enzyme est inactivée par une incubation de 5 min à 95°C.

4-2-2. Purification des ADNc

Après la reverse transcription, les ADNc sont purifiés avec le kit 'QIAquick PCR Purification' (Qiagen), selon le protocole donné par le fournisseur. Cette étape permet d'éliminer les dNTP, les amorces, le reste d'enzyme et les sels. Cette purification entraine la dilution au ½ des ADNc.

4-2-3. Vérification de la qualité des ADNc

Afin de vérifier la qualité des ADNc obtenus, une PCR (ou amplification par réaction de polymérisation en chaîne) est réalisée sur les ADNc dilués avec des amorces permettant l'amplification d'un fragment du gène codant la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (*GAPDH*). Ce gène a été isolé chez *Rosa chinensis* 'Old blush', à partir d'une banque d'ESTs (Channelière *et al*., 2002).

Le mélange PCR est composé de 2 µL de tampon 10X de la GoTaq Flexi DNA polymérase, 2 µL de dNTP 1 mM, 4 µL de $MgCl_2$ 25 mM, 2 µL d'amorce sens 10 µM (eA01A, Annexe 2), 2 µL d'amorces antisens 10 µM (eA01B, Annexe 2), 0,2 µL de GoTaq Flexi DNA polymérase (5 U.µL^{-1}, Promega) et de 2 µL d'ADNc dilué ; le volume est ajusté à 20 µL avec de l'eau DEPC.

Le programme d'amplification PCR est le suivant :

- 4 min à 94°C,
- 30 cycles de 30 s à 94°C, 45 s à 55°C, 45 s à 72°C,
- 5 min à 72°C.

Les produits PCR sont alors déposés sur un gel à 1,5% d'agarose. Après migration électrophorétique, le gel d'agarose est mis en présence d'une solution de bromure d'éthidium (0,5 µg.mL^{-1}, TAE 0,5X) pendant 15 minutes puis est observé sous lumière UV.

4-3. Techniques d'amplification d'ADN par PCR

La technique de PCR est une méthode permettant d'amplifier *in vitro* des fragments d'ADN. Elle nécessite l'utilisation d'une paire d'oligonucléotides capables de s'hybrider sur l'ADN matrice de façon antiparallèle. Ces oligonucléotides sont utilisés comme amorce par une ADN polymérase thermostable qui synthétise le brin complémentaire. Les cycles d'amplification sont composés de 3 étapes : la dénaturation de l'ADN matrice, l'hybridation des amorces et la polymérisation à partir des amorces.

Les séquences des oligonucléotides utilisés pour les amplifications PCR sont données dans l'Annexe 2.

4-3-1. Amplification par oligonucléotides dégénérés

La recherche d'un gène impliqué dans l'expansion cellulaire est réalisée suivant une stratégie PCR basée sur des homologies de séquences. Ainsi, pour le gène *RhEXP10*, des séquences connues chez d'autres espèces sont recherchées dans les bases de données et alignées de façon à définir des oligonucléotides dégénérés dans les zones les plus conservées.

Le mélange servant à la réaction de PCR est composé de 5 µL de tampon 10X de la GoTaq Flexi DNA polymérase, 4 µL de dNTP 2,5 mM, 3 µL de $MgCl_2$ 25 mM, 0,75 µL d'amorce sens 100 µM (Uexp10.3), 0,75 µL d'amorce antisens 100 µM (Lexp10.4), 0,9 µL de GoTaq Flexi DNA polymérase (5 $U.\mu L^{-1}$, Promega) et 2 µL d'ADNc dilués au $1/10^{ème}$; le volume est ajusté à 20 µL avec de l'eau DEPC.

La réaction de PCR est réalisée selon les conditions suivantes :

- 4 min à 94°C,
- 35 cycles de 30 s à 94°C, 30 s à 50°C, 45 s à 72°C,
- 5 min à 72°C.

La conformité de la taille attendue des produits PCR est ensuite vérifiée par comparaison de la migration électrophorétique des échantillons avec une échelle de poids moléculaire (Smart Ladder, Eurogentec). Deux µL de tampon de charge (Orange Loading Dye 6X, Promega) sont additionnés à 10 µL de produit PCR avant la migration sur gel d'agarose 1,5% en présence de tampon TAE 0,5X (Tris-HCl 40 mM pH 8,0, acétate de sodium 20 mM, EDTA 1 mM) à voltage constant (100V) durant 15 à 20 minutes. Le gel d'agarose est alors mis en présence d'une solution de bromure d'éthidium (0,5 $\mu g.mL^{-1}$, TAE 0,5X) pendant 15 minutes puis est observé sous lumière UV.

4-3-2. RACE-PCR

Les réactions de RACE-PCR utilisent comme matrice une banque d'ADNc. Celle-ci est obtenue en utilisant le kit GenomeWalker® (Clontech), en suivant les recommandations du constructeur. De manière synthétique, les ARNm de bourgeons de rosier sont purifiés à partir d'ARNtx puis le premier brin d'ADNc est synthétisé par l'AMV reverse transcriptase en présence d'amorces oligodT. L'ARN est dégradé et parallèlement le deuxième brin d'ADNc est obtenu grâce à un mélange d'ADN polymérase I, de RNAse H et d'ADN ligase. L'enzyme T4 DNA polymérase permet ensuite d'obtenir un ADNc double brin aux extrémités franches. Des adaptateurs de séquence connue sont ligués aux ADNc double brin grâce à la T4 DNA ligase. Ce mélange est ensuite dilué pour être utilisé dans les réactions de RACE-PCR.

L'obtention de l'extrémité 3' des gènes se fait par une succession de deux PCR. Lors de la première PCR, un oligonucléotide (AP1, fourni avec le kit) reconnaissant l'adaptateur est associé à un oligonucléotide spécifique du gène. La deuxième PCR est réalisée avec des oligonucléotides plus internes dans la séquence de l'adaptateur (oligonucléotide AP2) et dans la séquence du gène.

Le mélange PCR est composé de 5 µL de tampon de réaction (Tricine-KOH 400 mM pH 8,7, KOAc 150 mM, $Mg(OAc)_2$ 35 mM, BSA 37,5 $\mu g.mL^{-1}$, Tween 20 0,05 %, Nonidet-P40 0,05 %), 1 µL de dNTP 10 mM, 1 µL d'amorce AP1 ou AP2 10 µM, 1 µL de Taq Polymérase Advantage 2 (Clontech) et 1 µL de matrice (banque d'ADNc) diluée au 1/100ème. Le volume est ajusté à 50 µL avec de l'eau DEPC.

La réaction d'amplification se fait dans les conditions suivantes :

- 5 min à 94°C,
- 7 cycles de 25 s à 94°C, 3 min à 72°C,
- 32 cycles de 25 s à 94°C, 3 min à 67°C,
- 7 min à 67°C.

Les amplifiats sont contrôlés sur un gel d'agarose 1,5%, après une incubation de 15 min dans une solution de bromure d'éthidium (0,5 $\mu g.mL^{-1}$, TAE 0,5X) et observation sous lumière UV.

4-3-3. PCR sur primordia foliaires et méristèmes

Afin d'étudier l'expression du gène codant une expansine de rosier (*RhEXP*) au sein du méristème et des primordia foliaires, des prélèvements ont été réalisés sur des plantes expérimentales *Rosa hybrida* 'Radrazz', après 72 h de culture sous lumière blanche (16h/24h, 200 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$). Deux lots ont été constitués : l'un composé de dix méristèmes *sensu stricto*

et l'autre composé de deux jeunes feuilles préformées d'un même bourgeon. L'extraction d'ARNtx et la réaction de reverse transcription ont été réalisées à la suite, dans les tubes eppendorf contenant chaque échantillon.

L'extraction d'ARNtx a débuté par l'ajout de 8 µL d'eau DEPC à chaque échantillon et par leur broyage dans l'azote liquide. Puis, les échantillons ont été incubés pendant 10 min à 75°C. Le traitement à la DNAse est réalisé directement dans le tube en ajoutant 1 µL d'enzyme DNAse RQ1 (1 $U.\mu L^{-1}$, Promega) et 1 µL de tampon 10X de l'enzyme (Tris-HCl 400 mM pH 8,0, $MgSO_4$ 100 mM, $CaCl_2$ 10 mM). Après une incubation pendant 30 min à 37°C, les échantillons sont placés sur glace et 1 µL de solution stop (EGTA 20mM pH 8,0) est ajouté. Une incubation de 10 min à 65°C est alors réalisée.

Afin de vérifier l'efficacité du traitement à la DNAse, une PCR sur ARNtx est réalisée. Aux 2 µL d'ARNtx sont ajoutés 48 µL de mélange réactionnel (38,5 µL d'eau DEPC, 1 µL de dNTP 10 mM, 1,1 µL de $MgCl_2$ 50 mM, 1 µL d'amorce eA01A 10 µM, 1 µL d'amorce eA01B 10 µM, 0,4 µL de Platinum Taq DNA polymérase (5 $U.\mu L^{-1}$, Invitrogen)) et 5 µL de tampon 10X de la Platinum Taq DNA polymérase (Tris-HCl 200 mM pH 8,4, KCl 500 mM)). Les réactions de PCR sont réalisées selon le programme suivant :

- 4 min à 94°C,
- 40 cycles de 30 s à 94°C, 30 s à 55°C, 1 min à 72°C,
- 7 min à 72°C.

Les amplifiats sont contrôlés sur un gel d'agarose 1,5%. Après migration électrophorétique, le gel d'agarose est mis en présence d'une solution de bromure d'éthidium (0,5 $\mu g.mL^{-1}$, TAE 0,5X) pendant 15 minutes puis est observé sous lumière UV. L'absence d'une bande à 800 pb est significative de la pureté des ARNtx.

Après vérification du traitement à la DNAse, la réaction de Reverse Transcription est réalisée. Aux 9 µL d'ARNtx sont ajoutés 6 µL d'eau DEPC, 5 µL d'oligo$(dT)_{20}$ 20 µM et 1 µL de dNTP 10 mM. Les échantillons sont alors incubés pendant 5 min à 70°C puis sont placés sur glace pendant 2 min. Neuf µL de mélange réactionnel sont alors ajoutés (6 µL de tampon 5X de la Superscript III Reverse Transcriptase (Tris-HCl 250 mM pH 8,3, KCl 375 mM, $MgCl_2$ 15 mM), 1 µL de RNAse inhibiteur (40 $U.\mu L^{-1}$, Promega), 1 µL de DTT 0,1M et 1 µL de Superscript III Reverse Transcriptase (200 $U.\mu L^{-1}$, Invitrogen)) et les échantillons sont incubés pendant 50 min à 50°C puis pendant 5 min à 85°C.

Le mélange d'amplification PCR est alors composé de 38,1 µL d'eau DEPC, 5 µL de tampon 10X de la GoTaq Flexi DNA polymérase, 1 µL de dNTP 10 mM, 1,5 µL de $MgCl_2$ 25 mM, 1 µL d'amorce sens 10 µM (URhExp20 ou eA01A), 1 µL d'amorce antisens 10 µM

(LRhEXP21 ou eA01B), 0,4 µL de GoTaq Flexi DNA polymérase (5 U.µL^{-1}, Promega) et 2 µL d'ADNc. La réaction de PCR est réalisée selon les conditions suivantes :

- 2 min à 94°C,
- 40 cycles de 30 s à 94°C, 30 s à 55°C, 1 min à 72°C,
- 10 min à 72°C.

Les amplifiats sont contrôlés sur un gel d'agarose 1,5%. Après migration électrophorétique, le gel d'agarose est mis en présence d'une solution de bromure d'éthidium (0,5 µg.mL^{-1}, TAE 0,5X) pendant 15 minutes puis est observé sous lumière UV. La taille attendue du fragment amplifié est de 205 pb pour *RhEXP*.

4-3-4. RT-PCR quantitative en temps réel

La RT-PCR quantitative en temps réel est une technique qui permet de mesurer l'expression des gènes *via* l'amplification spécifique du gène étudié par PCR. En utilisant la fluorescence comme système rapporteur, l'augmentation de la quantité d'ADN au cours de la PCR est enregistrée au fur et à mesure du temps. Après la PCR, les quantités d'ADN sont comparées dans la partie exponentielle, moment pendant lequel l'augmentation de la quantité d'ADN est proportionnelle à la quantité initiale de matrice.

4-3-4-1. Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental disponible au laboratoire est un Chromo4 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Il est composé d'un thermocycleur classique associé à un système d'intégration des données de fluorescence, interfacé sur un ordinateur PC qui contrôle le fonctionnement de l'ensemble.

Une diode électroluminescente produit une lumière monochromatique centrée à 485 nm et transmise optiquement jusqu'à la plaque de PCR. Le SYBR® Green, fluorophore présent dans le mélange réactionnel, est excité à cette longueur d'onde et émet une fluorescence verte à 520 nm. Le rayonnement émis est capté par une photodiode (système de détection) et enregistré dans la mémoire de l'ordinateur.

Le SYBR® Green est une molécule qui se fixe dans le petit sillon de l'hélice de l'ADN. Son rendement quantique de fluorescence (intensité du rayonnement émis) augmente significativement lorsqu'il est fixé à l'ADN double-brin. Ainsi, grâce à cette molécule et au système d'intégration des données de fluorescence, la progression de l'amplification est suivie à chaque cycle et en temps réel. Un puits contrôle ne contenant pas d'ADN mais de l'eau permet de visualiser la fluorescence propre du SYBR® Green non fixé.

4-3-4-2. Principe

Le logiciel Opticon Monitor™ permet d'une part de programmer et de contrôler le déroulement des expériences et d'autre part, d'en stocker et d'exploiter les données. A la fin de la PCR, le logiciel représente graphiquement l'augmentation de la fluorescence de chaque puits au cours des cycles successifs (Figure 19). Le nombre de cycles étant placé en abscisse et le logarithme de l'intensité de la fluorescence en ordonnée, les amplifications suivent une courbe sigmoïdale en trois phases. Pendant la première phase (pouvant durer de 15 à 25 cycles), la fluorescence du puits contenant de l'ADN ne se démarque pas du bruit de fond. Puis l'augmentation de la fluorescence passe par une phase exponentielle (deuxième phase, 5 cycles environ) avant de ralentir et atteindre un plateau (dernière phase). Le cycle-seuil ou Ct (threshold cycle) correspond au cycle au cours duquel la fluorescence d'un échantillon devient significativement différente du bruit de fond. Cette ligne de base, déterminée par l'utilisateur après analyse des profils de fluorescence lors des cycles précédents la phase exponentielle, permet de comparer toutes les amplifications lors de la phase exponentielle.

Il existe une réaction linéaire entre le nombre de copies d'un gène présent initialement dans le puits et le cycle-seuil. Si N est le nombre de copies du gène au cycle Ct de la PCR et N_0 le nombre de copies présentes au départ dans le tube, le nombre de copies du gène au cycle Ct peut être exprimé par la formule :

$$N = N_0 .(1 + E)^{Ct}$$

où E est l'efficacité de la PCR (avec $0,83 \leq E \leq 1,10$, § 4-3-3-3).

Grâce à cette formule, il est possible de connaître la quantité d'ADNc pour chaque valeur de Ct. Des comparaisons de valeurs de Ct permettent d'analyser les résultats (§ 4-3-4-5) et d'obtenir un ratio d'expression de chaque gène d'intérêt.

4-3-4-3. Choix des amorces et tests d'efficacité

Une condition primordiale pour la fiabilité des résultats en RT-PCR quantitative est l'utilisation d'un couple d'amorces efficace à 100%. Un tel couple d'amorces est un couple dont le comportement permet une amplification strictement exponentielle de la séquence d'ADN cible, au moins pendant les premières phases de la PCR. Pour cela, plusieurs critères ont guidé la sélection des amorces. Elles doivent avoir une longueur comprise entre 18 et 25 nucléotides, présenter une Tm de 64 ± 1°C d'après le calcul du logiciel Primer Express® (utilisant la méthode du plus proche voisin) et générer un fragment de 60 à 150 pb maximum pour assurer une amplification efficace. Les couples retenus ne doivent pas pouvoir générer

plusieurs amplifiats. En effet, la compétition de fixation des oligonucléotides sur différents sites perturbe l'équilibre de la réaction, qui n'est alors plus représentative de la population du transcrit étudié.

Afin de déterminer l'efficacité de chaque couple d'amorces, ceux-ci sont testés expérimentalement sur une gamme d'ADNc. Cinq dilutions différentes (de 1/50 à 1/1500) d'ADNc sont utilisées. Des bourgeons distaux de *Rosa hybrida* 'Radrazz' prélevés sous différentes conditions lumineuses sont regroupés et les ARNtx sont extraits comme décrit dans le § 4-1-1. La transcription inverse est réalisée (§ 4-2-1), les ADNc sont purifiés (§ 4-2-2) et leur qualité est vérifiée (§ 4-2-3). Les dilutions sont réalisées dans de l'eau DEPC. Il n'est pas nécessaire de connaître la quantité de matrice utilisée pour la réalisation de la gamme, seule la dilution relative entre chaque point de la gamme est utilisée.

A la fin de la PCR, la droite *Ct = f (log 'dilution relative entre deux points de la gamme')* est réalisée. La régression linéaire est tracée et le coefficient de corrélation calculé ($0,95 \leq r^2 \leq 1$). La pente de la droite correspond à l'expression : *pente* = -1 / log (1+*E*).

La pente de la gamme étalon permet de déduire l'efficacité de la PCR selon l'équation suivante :

$$E = 10^{(-1/\text{pente})} - 1$$

L'efficacité est acceptable lorsqu'elle est comprise entre 0,83 et 1,10.

L'ensemble des amorces retenues pour les expériences de RT-PCR quantitative en temps réel est présenté dans l'Annexe 2.

4-3-4-4. Conditions expérimentales

Les expériences RT-PCR quantitative en temps réel sont réalisées en plaques de 96 puits recouvertes d'un film plastique transparent prévu pour la détection optique ('Multiplate Low-profile 96-well PCR plates' et 'Microseal B adhesive seals', Bio-Rad). Le mélange réactionnel contient, dans un volume final de 25 µL, 12,5 µL de iQ SYBR® Green Supermix 2X (Tris-HCl 40 mM pH 8,4, KCl 100 mM, 0,4 mM de chaque dNTP, 50 $U.mL^{-1}$ d'iTaq DNA polymérase, $MgCl_2$ 6 mM, SYBR® Green I, fluorescéine 20 nM, stabilisants), 0,75 µL d'amorce sens 10 µM, 0,75 µL d'amorce antisens 10 µM, 6 µL d'eau DEPC et 5 µL d'ADNc purifiés et dilués au 1/100ème.

Le protocole est une PCR à 2 températures où l'hybridation des amorces et l'élongation se font à 60°C. La réaction de PCR est réalisée selon les conditions suivantes :

- 2 min à 50°C,
- 10 min à 95°C,

- 40 cycles de 15 s à 95°C, 60 s à 60°C,
- Réalisation de la courbe de fusion : montée en température de 50°C à 98°C à 0,1°C/s (avec lecture de la fluorescence tous les 0,5°C).

A chaque fin de PCR, une courbe de fusion est réalisée afin d'évaluer la température de fusion du produit amplifié. Cette température de fusion dépend de la taille et de la séquence du produit amplifié ; elle permet donc de contrôler la présence d'un seul amplifiat.

Pour chaque condition testée, trois réactions PCR sont réalisées. Au moment de l'analyse des résultats, les valeurs de Ct sont utilisées après avoir fixé le seuil de la ligne de base à 0,05.

4-3-4-5. Analyse des résultats

La méthode choisie pour analyser les résultats de RT-PCR quantitative en temps réel est la méthode des Delta-Delta de Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), mise au point par Livak & Schmittgen (2001). C'est une méthode de quantification relative qui consiste en la comparaison directe de deux conditions données, i.e. en la détermination du ratio de la quantité de transcrits entre deux conditions (par exemple, le ratio de la quantité de transcrits d'un gène d'intérêt juste après décapitation et 24 h après décapitation).

Cette approche nécessite la quantification en parallèle, pour chaque condition, de la quantité de transcrits d'un gène de référence. L'expression de celui-ci ne doit pas varier entre les deux conditions comparées. Les gènes les plus souvent utilisés comme références sont des gènes dits « de ménage » comme, par exemple *EF-1α* (facteur d'élongation) ou encore *GAPDH* (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase). Chez *Arabidopsis thaliana*, une étude menée par Czechowski *et al.* (2005) a permis la mise en évidence de plusieurs gènes aux expressions stables dans plusieurs conditions et d'établir un classement des meilleurs gènes de référence. Plusieurs de ces gènes de référence ont été testés dans nos conditions : *EF-1α*, *GAPDH*, *UBC* (Ubiquitine-C) et *18S* (sous-unité ribosomique). Un classement de ces gènes a été réalisé grâce au logiciel geNorm (Vandesompele *et al*., 2002), logiciel composé de macros Microsoft Excel permettant de déterminer le gène de référence le plus stable parmi un ensemble de gènes testés. Les deux meilleurs gènes de référence dans nos conditions sont *EF-1α* et *GAPDH*. La normalisation de nos données de RT-PCR quantitative en temps réel a été réalisée avec le gène *EF-1α*.

Les efficacités de chacune des réactions PCR (gène cible et gène de référence) sont prises en compte lors de l'analyse des résultats. Les résultats présentent la moyenne de l'expression relative de chaque gène d'intérêt ± erreur standard de trois lots différents de matériel végétal.

4-4. Techniques de clonage

4-4-1. Souche bactérienne et plasmide utilisés

4-4-1-1. Souche bactérienne

La souche JM109 d'*Escherichia coli* (Promega) sert au clonage. Ses caractéristiques se trouvent dans le Tableau III.

Les bactéries sont cultivées dans du milieu SOC (Annexe 1) à 37°C sous agitation (190 rpm) en présence d'ampicilline (50 $\mu g.mL^{-1}$).

4-4-1-2. Plasmide

Le plasmide pGEM®-T Easy (Promega) est utilisé pour le séquençage, la multiplication et la conservation des gènes et fragments de gènes isolés tout au longe de l'étude (Figure 20).

Le vecteur est linéaire et porte une thymidine terminale en 3' de ses bornes franches, ce qui facilite le clonage du produit PCR. En effet, les produits issus de la PCR possèdent souvent une désoxyadénosine en 3', ajoutée par les polymérases thermostables. Les marqueurs de sélection sont le gène de résistance à l'ampicilline et le gène *lacZ*, codant la β-galactosidase.

4-4-2. Purification sur gel des fragments PCR

Les produits d'amplification sont déposés sur gel d'agarose 1,5%. Après migration électrophorétique, le gel d'agarose est incubé pendant 15 min dans une solution de bromure d'éthidium (0,5 $\mu g.mL^{-1}$, TAE 0,5X) et est observé sous lumière UV.

Le fragment d'ADN est excisé du gel d'agarose à l'aide d'un scalpel, placé dans un tube Eppendorf et pesé. La purification est alors réalisée en suivant les instructions du kit de purification sur gel 'Nucleotrap Gel extraction' (Macherey-Nagel).

Le produit purifié est alors dosé par spectrophotométrie (DO 260 nm, Nanodrop Technologies).

4-4-3. Clonage des fragments dans le vecteur pGEM®-T Easy

4-4-3-1. Ligature

La ligature dans le vecteur pGEM®-T Easy (Promega) peut se faire pendant une nuit à 4°C ou pendant 2 h à température ambiante. Afin de s'assurer d'une bonne efficacité de la

ligature, l'insert est concentré en respectant un rapport insert/vecteur de 3/1, en accord avec les instructions du kit.

Le mélange de ligature est composé de 2,5 µL de tampon 2X de la T4 DNA Ligase (Tris-HCl 60 mM pH 7,8, $MgCl_2$ 20 mM, DTT 20 mM, ATP 2 mM, PEG 10%), 0,5 µL de vecteur pGEM®-T Easy, 0,5 µL de T4 DNA Ligase (3 $U.\mu L^{-1}$) et de 1,5 µL d'insert.

4-4-3-2. Transformation de bactéries compétentes par choc thermique

Cent µL de bactéries compétentes JM109 (Promega) sont mises à décongeler lentement dans la glace afin de fragiliser la membrane. Cinq µL de produit de ligature sont alors ajoutés et le mélange est conservé sur glace pendant 30 min. Un choc thermique à 42°C pendant 45 s perméabilise la membrane et permet l'entrée du plasmide. Après un passage de 5 min dans la glace, 800 µL de milieu de culture SOC et 100 µL de glucose 2M stérile sont ajoutés. Après incubation pendant 90 min à 37°C sous agitation (190 rpm), une centrifugation à 3000 rpm pendant 5 minutes est réalisée et 900 µL de surnageant sont enlevés. Le culot bactérien est alors repris dans les 100 µL restants. Ce mélange est étalé sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB-Agar (Annexe 1) additionné d'IPTG (0,5 mM), de X-Gal (50 $\mu g.mL^{-1}$) et d'ampicilline (50 $\mu g.mL^{-1}$). Les boîtes sont mises à incuber à 37°C pendant 16 h ; une sélection blanc/bleu des bactéries est alors effectuée et les colonies sont testées par des expériences de PCR sur bactérie.

4-4-4. Vérification des produits de clonage par PCR sur bactérie

La vérification des produits de clonage par PCR sur bactérie utilise des amorces spécifiques du vecteur pGEM®-T Easy (Promega). Celles-ci (PUC1 et PUC2, Annexe 2) sont placées de part et d'autre du site multiple de clonage et permettent l'amplification d'un fragment d'environ 200 pb lorsque le vecteur est vide. Lorsque l'insert est introduit dans le vecteur, la taille du fragment amplifié par PCR sur bactérie est la somme de la taille de l'insert et des 200 pb amplifiées du vecteur.

Le mélange d'amplification PCR est composé de 8 µL de tampon 10X de la GoTaq Flexi DNA polymérase, 1 µL de dNTP 10 mM, 3,2 µL de $MgCl_2$ 25 mM, 1 µL d'amorce sens 10 µM (PUC1), 1 µL d'amorce antisens 10 µM (PUC2), 0,2 µL de GoTaq Flexi DNA polymérase (5 $U.\mu L^{-1}$, Promega) et 25,6 µL d'eau DEPC. A ce mélange est ajouté un peu de la colonie bactérienne à tester.

La réaction de PCR est réalisée selon les conditions suivantes :

- 4 min à 94°C,

- 35 cycles de 30 s à 94°C, 45 s à 50°C, 45 s à 72°C,
- 7 min à 72°C.

Les amplifiats sont contrôlés sur un gel d'agarose 1,5%. Après migration électrophorétique, le gel d'agarose est incubé pendant 15 min dans une solution de bromure d'éthidium (0,5 $\mu g.mL^{-1}$, TAE 0,5X) et est observé sous lumière UV.

4-5. Technique de cDNA-AFLP

Cette technique d'analyse sans à priori permet de caractériser le profil d'expression transcriptionnelle d'un ensemble de gènes à l'échelle du génome entier. Elle est basée sur le polymorphisme de la longueur de fragments d'ADN amplifiés par PCR. L'analyse de l'intensité des bandes dans les gels permet de quantifier l'expression. Chaque bande est identifiée par un séquençage ultérieur.

Lors de cette expérience, deux couples d'enzymes de restriction sont utilisés : EcoRI/MspI et EcoRI/MseI. La procédure cDNA-AFLP est représentée Figure 21 et est décrite ci-dessous pour le couple EcoRI/MseI. Elle est réalisée à partir d'ARNtx extraits de bourgeons de *Rosa hybrida* 'Radrazz' placés pendant 1, 6 ou 10 h après décapitation à la lumière ou à l'obscurité. Le protocole d'extraction des d'ARNtx est décrit dans le § 4-1-1.

Les séquences des oligonucléotides utilisés pour les amplifications PCR sont données dans l'Annexe 3.

Ce travail a été réalisé au sein de l'UMR PIAF de Clermont-Ferrand, où la méthode a été optimisée par Khaoula Ben Baaziz et Jean-Stéphane Venisse.

4-5-1. Synthèse des ADNc double brin

Le premier brin est reverse-transcrit à partir de 2 µg d'ARNtx dans un volume final de 25 µL contenant 1 µL d'oligo$(dT)_{30}$-AFLP (1 $\mu g.\mu L^{-1}$), 2,5 µL de dNTP 10 mM, 1,25 µL de pyrophosphate de sodium 40 mM préalablement chauffé à 42°C, 1 µL de RNasine (40 $U.\mu L^{-1}$, Promega), 5 µL de tampon 5X de l'AMV-RTase (Tris-HCl 50 mM pH 8,3, KCl 250 mM, $MgCl_2$ 50 mM, spermidine 2,5 mM, DTT 50 mM) et 3 µL d'AMV-RTase (10 $U.\mu L^{-1}$, Promega). Le mélange réactionnel est incubé à 42°C pendant 2 h.

Pour la synthèse du brin complémentaire, un mélange réactionnel contenant 10 µL de tampon 10X de la DNA polymérase I (Tris-HCl 500 mM pH 7,2, $MgSO_4$ 100mM, DTT 1 mM), 2 µL de dNTP 10 mM, 0,2 µL de RNase H (5 $U.\mu L^{-1}$, New England BioLabs) et 2,75 µL de DNA polymérase I (9 $U.\mu L^{-1}$, Promega) est ajouté aux 25 µL précédents. Le volume

final de la réaction est ajusté à 100 µL avec de l'eau DEPC. Le mélange réactionnel est incubé 2 h à 12°C, puis placé à 70°C pendant 10 min. Un volume de 0,75 µL de T4 DNA polymérase (5~10 U.µL^{-1}, Promega) est alors ajouté et le mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 15 min, puis à 75°C pendant 10 min.

Les ADNc sont ensuite transvasés dans un tube Eppendorf 1,5 mL afin d'être purifiés. Cent µL de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1 ; v/v/v) y sont ajoutés. Les tubes sont agités doucement puis centrifugés pendant 10 min à 10000 rpm à 20°C. Le surnageant est placé dans un nouveau tube Eppendorf et 100 µL de chloroforme/alcool isoamylique (24/1 ; v/v) sont ajoutés. Les tubes sont agités doucement et centrifugés pendant 10 min à 10000 rpm à 20°C. Le surnageant est placé dans un nouveau tube Eppendorf et les ADNc sont précipités en ajoutant 0,1 volume d'acétate d'ammonium 3M et 2,5 volumes d'éthanol 100%. Après agitation, les tubes sont placés sur glace pendant 10 min puis centrifugés pendant 45 min à 14000 rpm à 4°C. Les culots récupérés sont lavés 2 fois avec de l'éthanol 80% puis dissouts dans 20 µL d'eau DEPC et stockés à -80°C pour les analyses. Les quantités et les puretés des échantillons sont analysées par dosage spectrophotométrique (DO 260 nm, Nanodrop Technologies).

4-5-2. Restriction et ligation des ADNc

L'étape de restriction est réalisée à partir d'1 µg d'ADNc dans un mélange réactionnel constitué de 2 µL de tampon 10X des enzymes de restriction (Tris-HCl 100 mM pH 7,9, NaCl 500 mM, $MgCl_2$ 100 mM, DTT 10 mM), 0,5 µ d'enzyme EcoRI (20 U.µL^{-1}, New England BioLabs), 2 µL d'enzyme MseI (5 U.µL^{-1}, New England BioLabs). Le volume final de la réaction est ajusté à 20 µL avec de l'eau DEPC. Les échantillons sont incubés pendant 3 h à 37°C.

Aux 20 µL de produits de restriction, 10 µL de mélange réactionnel de ligation (3,5 µL d'eau DEPC, 1 µL de tampon 10X de la T4 DNA Ligase (Tris-HCl 100 mM pH 7,9, NaCl 500 mM, $MgCl_2$ 100 mM, DTT 10 mM), 2,5 µL d'ATP 10 mM, 1 µL d'adaptateur EcoRI 10 µM (AEcoRI), 1 µL d'adaptateur MseI 50 µM (AMseI), 1 µL de T4 DNA Ligase (400 U.µL^{-1}, Promega)) sont ajoutés. Puis les échantillons sont incubés à 16°C pendant 6 h.

4-5-3. Pré-amplification PCR non sélective

Les pré-amplifications sont réalisées dans un volume réactionnel de 40 µL contenant 4 µL de produits de restriction-ligation dilués au 1/10ème dans de l'eau DEPC, 25,2 µL d'eau DEPC, 1 µL de dNTP 10 mM, 2 µL d'amorces Eco+0 20 µM, 2 µL d'amorces Mse+0 20

µM, 4 µL de tampon 10X de la Red Goldstar Taq Polymérase (Tris-HCl 750 mM pH 8,8, $(NH_4)_2SO_4$ 200 mM, Tween 20 0,1% (v/v)), 1,6 µL de $MgCl_2$ 50 mM et 0,2 µL de Red Goldstar Taq Polymérase (5 $U.\mu L^{-1}$, Eurogentec). Les réactions de PCR sont réalisées selon le programme suivant :

- 4 min à 94°C,
- 28 cycles de 30 s à 94°C, 60 s à 55°C, 90 s à 72°C,
- 15 min à 72°C.

Les amplifiats sont contrôlés sur un gel d'agarose 1,5%. Après migration électrophorétique, le gel d'agarose est incubé pendant 15 min dans une solution de bromure d'éthidium (0,5 $\mu g.mL^{-1}$, TAE 0,5X) et est observé sous lumière UV.

4-5-4. Amplification PCR sélective

Les amplifiats obtenus lors de la PCR non sélective sont dilués au 1/20ème dans de l'eau DEPC. Les amplifications sont réalisées dans un volume réactionnel de 30 µL contenant 4 µL d'amplifiats diluées au 1/20ème, 19,35 µL d'eau DEPC, 0,75 µL de dNTP 10 mM, 0,75 µL d'amorces Eco+1 20 µM, 0,75 µL d'amorces Mse+2 20 µM, 3 µL de tampon 10X de la Red Goldstar Taq Polymérase (Tris-HCl 750 mM pH 8,8, $(NH_4)_2SO_4$ 200 mM, Tween 20 0,1% (v/v)), 1,2 µL de $MgCl_2$ 50 mM et 0,2 µL de Red Goldstar Taq Polymérase (5 $U.\mu L^{-1}$, Eurogentec). Les réactions de PCR sont réalisées selon le programme suivant :

- 4 min à 94°C,
- 1 cycle de 30 s à 94°C, 30 s à 65°C, 90 s à 72°C,
- 14 cycles de 30 s à 94°C, 30 s à 65°C avec une diminution de 0,7°C par cycle, 90 s à 72°C,
- 23 cycles de 30 s à 94°C, 30 s à 56°C, 90 s à 72°C,
- 5 min à 72°C.

Les amplifiats sont contrôlés sur un gel d'agarose 1,5%. Après migration électrophorétique, le gel d'agarose est incubé pendant 15 min dans une solution de bromure d'éthidium (0,5 $\mu g.mL^{-1}$, TAE 0,5X) et est observé sous lumière UV.

4-5-5. Migration des amplifiats et révélation

Les produits PCR sont dénaturés et séparés par électrophorèse verticale sur un gel dénaturant d'acrylamide-bisacrylamide (29/1, v/v) 5% (dimension 380 x 500 x 0,4 mm, cuve Bio-Rad). Le gel est composé de 84 mL d'une solution filtrée (0,22 µm) contenant 10 mL de TBE 10X (Tris-HCl 900 mM pH 8,3, acide borique 900 mM, EDTA 20 mM), 50 g d'urée

(qsp 84 mL), 16 mL d'acrylamide-bisacrylamide (29/1, v/v), 500 µL de persulfate d'ammonium (10%) et 75 µL de TEMED. La polymérisation s'effectue en 1 h à température ambiante. Le tampon de migration est du TBE 1X. Un courant d'intensité constante de 45 mA est appliqué.

La révélation des bandes est assurée par une coloration au nitrate d'argent. Toutes les solutions utilisées lors de la révélation sont conservées à 4°C. Le gel est fixé pendant 20 min et sous légère agitation dans 3 L d'une solution d'acide acétique à 10%. Après 4 lavages successifs de 3 min sous légère agitation dans 3 L d'eau milliQ, le gel est coloré pendant 30 min à l'obscurité et sous légère agitation dans 3 L d'une solution de nitrate d'argent (1 $g.L^{-1}$) contenant 4,5 mL de formaldéhyde à 35%. Puis, après un bref rinçage de 5 s dans de l'eau milliQ, le gel est développé à l'obscurité dans 3 L d'une solution de carbonate de sodium (30 $g.L^{-1}$) contenant 600 µL de thiosulfate de sodium à 1% et 4,5 mL de formaldéhyde à 35%. La révélation est stoppée en versant la solution d'acide acétique à 10% utilisée préalablement pour la fixation. Enfin, le gel est rincé dans 3 L d'eau milliQ pendant 15 min et est séché pendant 1 à 2 h, à température ambiante. Les bandes d'ADNc sont alors récupérées.

4-5-6. Récupération et clonage des bandes

4-5-6-1. Récupération des bandes

Les bandes de gel contenant l'ADNc sont réhydratées, découpées et placées dans 20 µL d'eau DEPC. Elles subissent alors le traitement suivant : 3 min à 94°C, 10 min à 65°C, 10 min à 37°C et 60 min à température ambiante, ceci dans le but de permettre la diffusion des ADNc du gel vers l'eau. Elles sont ensuite stockées à -20°C.

4-5-6-2. Amplification des ADNc récupérés

Les tubes contenant les bandes de gel réhydratées sont mis à décongeler sur glace. L'ADNc contenu dans les bandes est amplifié par PCR en utilisant les amorces Eco+0 et Mse+0 (ou Msp+0), ayant permis l'amplification non sélective réalisée auparavant (§ 4-5-3). A 10 µL d'eau DEPC contenant l'ADNc sont ajoutés 22,3 µL d'eau DEPC, 0,5 µL d'amorce Eco+0 10 µM, 0,5 µL d'amorce Mse+0 10 µM (ou Msp+0 10 µM), 1,6 µL de $MgCl_2$ 50 mM, 1 µL de dNTP 10 mM, 4 µL de tampon 10X de la Platinum Taq DNA polymérase (Tris-HCl 200 mM pH 8,4, KCl 500 mM) et 0,1 µL de Platinum Taq DNA polymérase (5 $U.\mu L^{-1}$, Invitrogen). Les réactions de PCR sont réalisées selon le programme suivant :

- 4 min à 94°C,

- 40 cycles de 40 s à 94°C, 40 s à 55°C, 30 s à 72°C,
- 7 min à 72°C.

Les amplifiats sont contrôlés sur un gel d'agarose 1,5%. Après migration électrophorétique, le gel d'agarose est incubé pendant 15 min dans une solution de bromure d'éthidium (0,5 $\mu g.mL^{-1}$, TAE 0,5X) et est observé sous lumière UV.

4-5-6-3. Clonage des fragments amplifiés

La ligature des fragments amplifiés dans le vecteur pGEM®-T Easy (Promega) est réalisée directement à partir du produit de PCR. Puis la transformation des bactéries compétentes est effectuée et les bactéries sont cultivées en boîte de Pétri pendant 16 h minimum à 37°C (§ 4-4-2). Trois colonies transformées sont alors choisies et vérifiées par PCR sur bactérie. Le mélange d'amplification PCR est composé de 8 µL de tampon 10X de la GoTaq Flexi DNA polymérase, 1 µL de dNTP 10 mM, 3,2 µL de $MgCl_2$ 25 mM, 1 µL d'amorce Eco+0 10 µM, 1 µL d'amorce Mse+0 10 µM (ou Msp+0 10 µM), 0,2 µL de GoTaq Flexi DNA polymérase (5 $U.\mu L^{-1}$, Promega) et 25,6 µL d'eau DEPC. A ce mélange est ajouté un peu de la colonie bactérienne à tester.

La réaction de PCR est réalisée selon les conditions suivantes :

- 4 min à 94°C,
- 35 cycles de 30 s à 94°C, 45 s à 55°C, 45 s à 72°C,
- 7 min à 72°C.

Les amplifiats sont contrôlés sur un gel d'agarose 1,5%. Après migration électrophorétique, le gel d'agarose est incubé pendant 15 min dans une solution de bromure d'éthidium (0,5 $\mu g.mL^{-1}$, TAE 0,5X) et est observé sous lumière UV. Les colonies sont alors repiquées dans 1 mL de milieu LB liquide contenant de l'ampicilline (50 $\mu g.mL^{-1}$) et cultivées sous agitation (190 rpm) à 37°C. Après 16 h d'incubation, 500 µL de glycérol sont ajoutés à 500 µL de culture bactérienne, et les clones bactériens sont conservés à -80°C en attendant le séquençage.

4-5-6-4. Séquençage des clones bactériens

Le séquençage est réalisé par la plate-forme de séquençage génotypage OUEST-génopole® de Roscoff. Les bactéries sont mises en culture dans des plaques deep well 96 puits, à 37°C, dans 1 mL de LB 2X, pendant 20 à 24 h sous agitation (190 rpm). La plaque est alors centrifugée à 1500 g pendant 15 min. Les surnageants sont éliminés par retournement, la

plaque est scellée par un film aluminium et conservée à -20°C pendant 24 h avant d'être envoyées à séquencer. Le séquençage est réalisé avec l'amorce M13 (Annexe 3).

4-5-6-5. Validation des gènes différentiellement exprimés

Parmi les différents ADNc différentiellement exprimés obtenus, certains ont été retenus pour la validation de l'expérience de cDNA-AFLP. Des amorces ont été définies et l'expression des gènes va être étudiée par RT-PCR semi quantitative sur les mêmes échantillons biologiques que ceux utilisés lors de l'expérience de cDNA-AFLP.

5. Dosage des sucres solubles et mesures d'activités enzymatiques

Les dosages des sucres solubles et les mesures d'activités enzymatiques sont réalisés sur les bourgeons distaux et les nœuds de *Rosa hybrida* 'Radrazz', sous différentes conditions lumineuses. Les résultats présentent la moyenne ± erreur standard de trois lots différents de matériel végétal.

5-1. Dosage des sucres solubles

5-1-1. Mesure des poids frais moyens d'un bourgeon et d'un nœud

Pour chaque lot de bourgeons, le poids du lot est déterminé et le nombre de bourgeons connu. Ainsi, il est possible d'obtenir le poids moyen d'un bourgeon pour chaque lot. Ces valeurs sont également calculées pour les lots de nœuds.

Grâce à ces valeurs, les résultats des dosages de sucres sont exprimés en quantité de sucre par organe.

5-1-2. Extraction préalable

Le matériel végétal, conservé à -80°C, est broyé dans l'azote liquide dans un mortier en présence d'une pincée de sable de Fontainebleau. Le broyage est poursuivi en présence de 2 mL pour les bourgeons et de 4 mL pour les nœuds de tampon de broyage (Hepes-NaOH 50 mM pH 7, $MgCl_2$ 10 mM, EDTA 1 mM, DTT 2,6 mM, éthylène glycol 10% (v/v), Triton X100 0,02% (v/v)) jusqu'à ce qu'aucune particule ne soit visible.

Le broyat est transféré dans un tube de volume adapté. Les échantillons sont laissés dans la glace pendant 30 min, en homogénéisant de temps en temps au vortex. Les échantillons sont alors centrifugés pendant 3 min à 12000 g et à 4°C. Les surnageants sont récupérés et séparés en 4 fractions (Figure 22) :

- fraction n°1 : dosage du glucose, du fructose et du saccharose par voie enzymatique (§ 5-1-3),
- fraction n°2 : dosage du sorbitol par HPLC (§ 5-1-4),
- fraction n°3 : dosage protéique (selon la méthode de Bradford (1976)),
- fraction n°4 : dosage de l'activité invertase acide vacuolaire (IAV, § 5-3-2).

Les culots sont conservés dans la glace et servent aux dosages de l'amidon (§ 5-2) et de l'activité invertase acide pariétale (IAP, § 5-3-2).

5-1-3. Glucose, Fructose et Saccharose

5-1-3-1. Principe du dosage

Le dosage de ces sucres solubles est réalisé par voie enzymatique selon la méthode initialement décrite par Bergmeyer & Bernt (1974) puis adaptée par Pelleschi *et al.* (1997). Ce dosage est basé sur une suite de réactions enzymatiques couplées qui permettent de transformer, lors de l'étape finale, le glucose-6-phosphate en gluconate-6-phosphate, permettant ainsi la réduction du NAD^+ (Figure 23). Contrairement à la forme oxydée, le composé réduit possède une bande d'absorption à 340 nm. La quantité d'hexoses est donc mesurée indirectement grâce à la quantité proportionnelle de NADH produit et à son absorption à 340 nm.

5-1-3-2. Dosage du saccharose et des hexoses

Pour le dosage de la totalité des sucres solubles (Figure 24), 10 µL d'un mélange d'invertase à 5 $mg.mL^{-1}$ dans du tampon citrate de sodium 0,32 M (pH 4,6) sont ajoutés à 10 µL d'extrait brut directement dans une microcuve. L'hydrolyse du saccharose se déroule ainsi à 30°C pendant 30 min. Un volume de 750 µL de cocktail enzymatique (NaOH-triéthanolamine 235 mM pH 7,6, $MgSO_4$ 3 mM, NAD^+ 0,4 mM, ATP 2,6 mM) est alors ajouté. L'absorbance est lue une première fois à 340 nm. Puis un volume de 10 µL de mélange enzymatique contenant 3 enzymes (HK 4,2 U, PGI 3,5 U et G6PDH 2 U) est ajouté et une seconde incubation à 30°C pendant 30 min a lieu. La réduction du NAD^+ est lue à 340 nm. La valeur de l'absorbance obtenue est alors ôtée de la première valeur d'absorbance

obtenue précédemment. La variation d'absorbance permet d'obtenir la concentration en NADH formé au cours de la seconde incubation, et donc d'obtenir la concentration en glucides solubles totaux.

Le dosage des hexoses libres est réalisé simultanément en remplaçant les 10 µL de solution contenant l'invertase par 10 µL d'eau distillée. La teneur en saccharose peut alors être déterminée par différence entre les contenus en glucides totaux et en hexoses libres.

Pour doser séparément le glucose et le fructose, un troisième dosage est réalisé simultanément. L'invertase est une nouvelle fois remplacée par de l'eau distillée et le mélange enzymatique ne contient que deux enzymes : HK et G6PDH. Ainsi, le fructose-6P ne peut être transformé par la PGI en glucose-6P. La variation d'absorbance mesurée lors de ce dosage permet d'obtenir la concentration en glucose. La concentration de fructose est déterminée par différence entre les contenus en hexoses libres et en glucose.

Le calcul des différentes concentrations se fait grâce à la loi de Beer-Lambert. Les résultats sont exprimés en quantité de sucres par organe (poids d'un organe déterminé au § 5-1-1).

5-1-4. Sorbitol

Le protocole de dosage du sorbitol par HPLC et les étapes préliminaires à ce dosage sont représentés Figure 25.

Cent µL d'extrait, obtenus par extraction (§ 5-1-2), sont tout d'abord purifiés en étant passés sur deux colonnes successives : une colonne échangeuse de cations (Sephadex, Sigma) et une colonne échangeuse d'anions (QAE, Sigma). De l'eau osmosée est ajoutée afin d'atteindre un volume élué de 10 mL. Les 10 mL d'éluat sont mis à évaporer sous vide pendant 2 h et l'extrait sec est repris dans 200 µL d'eau osmosée.

Puis, 20 µL d'échantillon sont chargés sur une colonne polymère échange de ligand permettant le dosage des monosaccharides et des sucres alcools (chaîne HPLC Thermo Separation Products, colonne Bio-Rad Aminex HP87C 300 x 7,8 mm) placée à 80°C et équilibrée avec de l'eau osmosée, à un débit de 0,5 $mL.min^{-1}$. Les molécules carbonées sont totalement éluées en 30 min par de l'eau osmosée. A la sortie de la colonne, la détection se fait par réfractométrie (RI 71, Shodex). L'analyse des données est réalisée avec le logiciel Borwin®.

Une étape d'identification des temps de rétention des différentes molécules carbonées est réalisée en injectant 20 µL d'une solution étalon (sucre dilué dans de l'eau osmosée). Les différents temps de rétention obtenus sont présentés dans le Tableau IV.

5-2. Dosage de l'amidon

5-2-1. Principe du dosage

Le dosage de l'amidon est réalisé par voie enzymatique. Il est dosé à partir du culot obtenu après extraction des sucres solubles (§ 5-1-2). Ce dosage est également basé sur une suite de réactions enzymatiques couplées qui permettent, lors de l'étape finale, la réduction du NAD^+ (Figure 26). Ici, la quantité de glucose est mesurée et la quantité d'amidon en est déduite.

5-2-2. Dosage de l'amidon

Les culots sont mis à dissoudre dans 900 µL de NaOH 0,02 N pendant 1 h à 100°C, avant d'être refroidis dans un bain glacé. Cent µL d'un mélange d'amyloglucosidase (EC 3.2.1.3) à 25 $mg.mL^{-1}$ dans du tampon citrate de sodium 0,32 M (pH 4,6) sont alors ajoutés. Après 1 h d'incubation à 50°C, les échantillons sont centrifugés pendant 10 min à 10000 g à température ambiante. Cent µL de surnageant sont prélevés et 750 µL de cocktail enzymatique (NaOH-triéthanolamine 235 mM pH 7,6, $MgSO_4$ 3 mM, NAD^+ 0,4 mM, ATP 2,6 mM) sont ajoutés. L'absorbance est lue une première fois à 340 nm. Dix µL de mélange enzymatique (HK 4,2 U et G6PDH 2 U) sont ajoutés et les échantillons sont mis à incuber pendant 30 min à 30°C. L'absorbance est lue une deuxième fois à 340 nm. La variation d'absorbance permet d'obtenir la concentration en glucose d'après la loi de Beer-Lambert et d'en déduire la concentration en amidon. Les résultats sont exprimés en quantité d'amidon par organe (bourgeon ou nœud, § 5-1-1).

5-3. Mesure des activités enzymatiques

5-3-1. Dosage protéique

Une fraction du surnageant est conservée pour le dosage protéique de chaque échantillon. La concentration protéique totale de chaque échantillon est déterminée selon la méthode de Bradford (1976) (Bio-Rad Protein Assay) et permet l'expression des résultats des activités enzymatiques en fonction de la concentration de protéines totale.

5-3-2. Dosages des activités invertases acides vacuolaires et pariétales

Le protocole est schématisé sur la Figure 27.

5-3-2-1. Extraction des enzymes

Le protocole d'extraction des enzymes est identique au protocole utilisé pour l'extraction des sucres solubles (§ 5-1-2). Le culot obtenu après centrifugation est conservé dans la glace pour la mesure de l'activité de l'enzyme invertase acide pariétale (IAP). Trois cents µL de surnageant sont déposés sur une colonne Sephadex G25 superfine selon le protocole de Helmerhorst & Stockes (1980) afin d'éliminer les petites molécules pouvant servir de substrat ou d'effecteur aux réactions enzymatiques. Puis ils sont centrifugés pendant 3 min à 12000 g et à 4°C. Le filtrat est récupéré pour le dosage de l'invertase acide vacuolaire (IAV).

5-3-2-2. Activités des invertases acides vacuolaires et pariétales

Le dosage repose sur la mesure du glucose et du fructose produits à partir du saccharose exogène fourni dans le milieu réactionnel.

La mesure de l'invertase acide vacuolaire se fait sur 25 µL de filtrat en présence de 25 µL d'acétate de sodium 0,2 M (pH 4,8). Après addition de 10 µL de saccharose 0,6 M, la réaction se déroule à 30°C pendant 20 min. L'ajout de 50 µL de tampon d'arrêt (NaH_2PO_4 0,5 M pH 7) stoppe la réaction en augmentant le pH du milieu réactionnel. Les échantillons sont ensuite passés pendant 3 min à 100°C afin de dénaturer les enzymes, puis refroidis rapidement dans de l'eau glacée. L'ajout de 750 µL de cocktail enzymatique, composé de 740 µL de milieu réactionnel (Hepes-NaOH 50 mM pH 7, $MgCl_2$ 2 mM, EDTA 1 mM, ATP 1 mM, NAD 0,5 mM) et de 10 µL de mélange réactionnel (HK 4,2 U, PGI 3,5 U et G6PDH 2U), permet la transformation du glucose et du fructose en gluconate-6-phosphate (Figure 23). La réaction se poursuit pendant 20 min à 30°C. Après centrifugation des échantillons pendant 3 min à 12000 g, le NADH formé est mesuré à 340 nm.

Dans le cas du dosage de l'invertase acide pariétale, le culot obtenu (§ 5-1-2) est rincé avec 2 mL d'acétate de sodium 0,2 M (pH 4,8) par centrifugation (12000 g, 3 min, 4°C), puis remis en suspension dans un mélange de 350 µL d'acétate de sodium 0,2 M (pH 4,8) et 350 µL d'eau distillée. Après addition de 10 µL de saccharose 0,6 M à 25 µL de culot resuspendu, la réaction se déroule à 30°C pendant 20 min. L'ajout de 50 µL de tampon d'arrêt (NaH_2PO_4 0,5 M pH 7) stoppe la réaction en augmentant le pH du milieu réactionnel. Les échantillons sont ensuite passés pendant 3 min à 100°C afin de dénaturer les enzymes, puis refroidis

rapidement dans de l'eau glacée. Un volume de 750 µL de cocktail enzymatique (milieu réactionnel + mélange enzymatique) est additionné et les échantillons sont mis à incuber pendant 20 min à 30°C. Après centrifugation pendant 3 min à 12000 g, le NADH formé est mesuré à 340 nm.

Les résultats, obtenus après calcul utilisant la loi de Beer-Lambert, sont rapportés en activité enzymatique correspondant à la quantité de saccharose dégradé en fonction du temps d'incubation et de la concentration protéique totale (§ 5-3-1).

Après ce dosage, les culots sont centrifugés pendant 3 min à 12000 g et à 4°C. Les surnageants sont éliminés et les culots sont conservés à -20°C en attendant le dosage de l'amidon (§ 5-2).

5-3-3. Dosage de l'activité de la Sorbitol déshydrogénase NAD-dépendante

La sorbitol déshydrogénase NAD-dépendante (NAD-SDH, EC 1.1.1.14) permet la formation de fructose à partir de sorbitol (Figure 28). La conversion du sorbitol en fructose par la NAD-SDH s'accompagne de la réduction du coenzyme NAD en NADH, H^+. Ainsi, il est possible de mesurer spécifiquement l'activité enzymatique en dosant le NADH produit à 340 nm.

Le protocole d'extraction et de dosage de l'activité de la utilisé est celui proposé par Lo Bianco *et al.* (1998), testé sur des méristèmes apicaux et des rameaux de pêcher (*Prunus persica* L.), auquel ont été apportées quelques modifications (Figure 29).

L'expérience débute par le broyage d'environ 50 mg de bourgeons frais dans 500 µL de tampon d'extraction (Tris-HCl 100 mM pH 9, Glycérol 8% (v/v), Tween 20 0,1% (v/v), PVPP 1% (p/v)), suivi d'une centrifugation à 5000 g pendant 15 min et à 4°C permettant l'obtention du surnageant contenant la fraction soluble. Après avoir déterminé la concentration protéique (Bio-Rad Protein Assay) selon la méthode de Bradford (1976), le dosage de l'activité NAD-SDH requiert l'incubation de 20 µg de protéines dans 1 mL de milieu réactionnel (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NAD 1 mM, sorbitol 300 mM) à 25°C pendant 5 min au bout desquelles l'activité est mesurée à température ambiante à 340 nm.

Les résultats, obtenus après calcul utilisant la loi de Beer-Lambert, sont rapportés en activité enzymatique correspondant à la quantité de sorbitol dégradé en fonction du temps d'incubation et de la quantité de protéines.

6. Analyses statistiques

Afin de ne pas surcharger les figures, les résultats des tests statistiques sont présentés dans l'Annexe 4.

6-1. Etude morphologique du débourrement

Les résultats présentent les moyennes ± erreur-standard d'au moins deux expériences différentes. Le nombre de plantes utilisées pour chaque expérience est indiqué dans les figures. Les différences significatives entre les différents traitements sont évaluées avec un test t de Student ($p<0,001$ ***, $p<0,01$ **, $p<0,05$ *).

6-2. RT-PCR quantitative et analyses biochimiques

Pour ces expériences, les résultats présentent les moyennes ± erreur-standard de trois lots biologiques différents pour chaque condition testée. Les différences significatives entre les différents traitements sont évaluées avec un test t de Student ($p<0,001$***, $p<0,01$**, $p<0,05$*).

Résultats et Discussions

Chapitre I

Etude morphologique de l'impact de la lumière sur le débourrement chez le rosier

Chapitre I. Etude morphologique de l'impact de la lumière sur le débourrement chez le rosier

1. Etude du besoin de lumière lors du débourrement chez différentes espèces et différentes variétés de rosier

Une étude menée chez le rosier fleurs coupées *Rosa hybrida* 'Baccara' a mis en évidence un besoin absolu de lumière pour le débourrement des bourgeons basaux chez cette variété (Khayat & Zieslin, 1982). Cette variété étant destinée à la production de fleurs coupées, l'étude de la réponse à la lumière de rosiers de jardin a été effectuée afin d'évaluer la spécificité de cette réponse.

Des plantes expérimentales de *Rosa hybrida* 'Radrazz' placées sous lumière blanche (200 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, 16h/24h) pendant 4 jours présentent des bourgeons axillaires distaux débourrés (Figure 30). Au contraire, après un traitement de 4 jours à l'obscurité, aucun débourrement n'est observé. Sous cette condition, un léger gonflement des bourgeons est cependant observable mais aucune extrémité de feuille n'est visible hors des écailles. Après 12 jours de culture, les résultats obtenus sont identiques : les bourgeons des plantes placées à l'obscurité ne débourrent pas (Figure 31).

Cette même expérience a été réalisée chez cinq autres variétés de rosiers de jardin appartenant à trois espèces différentes : *Rosa hybrida* 'Meichibon', 'Meiprille' et 'Meiratcan', *Rosa wichurana* 'Basye's thornless' et *Rosa chinensis* 'Old blush'. Après 12 jours de culture sous lumière blanche, les bourgeons distaux et médians des plantes expérimentales sont tous débourrés et produisent des jeunes tiges en croissance, quelles que soient l'espèce et la variété (Tableau V). Au contraire, après 12 jours d'obscurité, aucun débourrement n'est observé, pour aucune des variétés et espèces étudiées, que l'on considère le bourgeon distal ou le médian.

2. Etude de la généricité du besoin de lumière

Les bourgeons axillaires des six variétés de rosier testées, appartenant à trois espèces différentes du genre *Rosa*, présentent un besoin absolu de lumière pour le débourrement.

Afin de tester la généricité de ce résultat, des expériences ont été réalisées chez des jeunes plantes décapitées d'*Arabidopsis thaliana*, de tomate (*Solanum lycopersicum* L. 'Tresor' hybrid F1) et de peuplier (*Populus tremula* x *Populus tremuloïdes* L.). Chez les jeunes plantes d'*Arabidopsis thaliana*, ce sont les débourrements des bourgeons axillaires des feuilles de rosette qui ont été observés suite à la décapitation de la hampe florale. Chez les jeunes plantes de tomate (*Solanum lycopersicum* L. 'Tresor' hybrid F1) et de peuplier (*Populus tremula* x *Populus tremuloïdes* L.), l'étude a porté sur les bourgeons axillaires après décapitation de la partie la plus distale des tiges. Les plantes expérimentales ont été cultivées sous lumière blanche (200 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$), à l'exception des plantes de tomate et de peuplier cultivées en serre (lumière naturelle et éclairage additionnel lorsque le rayonnement solaire global est inférieur à 200 W/m^2) ou à l'obscurité pendant 12 jours. Pour les trois espèces étudiées, et contrairement à ce qui est observé chez les six variétés de rosier, le débourrement des bourgeons est observé, tout le long des tiges, aussi bien à l'obscurité qu'en présence de lumière blanche (Figure 31).

3. Site impliqué dans la perception de la lumière nécessaire au débourrement

Les expériences précédentes ont démontré un besoin absolu de lumière pour le débourrement chez le rosier. On peut se demander quel est l'organe de la plante qui perçoit la lumière nécessaire au débourrement. L'application de papier aluminium sur différentes parties de la plante (tige ou bourgeon) a permis de répondre à cette question.

Chez des plantes expérimentales de *Rosa hybrida* 'Radrazz', la tige a été recouverte de papier aluminium, à l'exception du bourgeon axillaire distal. Après 7 jours de culture sous lumière blanche (200 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$), ce bourgeon a débourré (Figure 32 A-B ; n = 20 plantes). La jeune tige issue de ce bourgeon présente une croissance normale et se développe jusqu'à floraison (Figure 32 C-D).

Au contraire, lorsque seul le bourgeon distal de la plante expérimentale est placé à l'obscurité et que la tige est éclairée, aucun débourrement de ce bourgeon n'est observé après 7 jours de culture (Figure 32 E-F ; n = 16 plantes). L'expérience témoin, réalisée en plaçant le bourgeon distal dans un film plastique transparent, montre que l'absence de débourrement observée lorsque le bourgeon est enveloppé n'est pas due à une réduction du volume d'air

disponible mais bien à l'absence de lumière. En effet, sous cette condition, les bourgeons distaux débourrent et présentent des feuilles épanouies hors des écailles (Figure 32 G-H).

Le bourgeon axillaire perçoit donc directement la lumière nécessaire au débourrement. La tige ne semble pas, quant à elle, impliquée dans ce processus.

4. Impact de la lumière sur le débourrement et ses composantes

Le débourrement est un ensemble de trois processus physiologiques : la croissance des primordia foliaires préformés, la mise en place par le méristème apical de nouveaux primordia foliaires et l'élongation des entre-nœuds. Ce dernier processus étant difficilement estimable à ce stade d'observation, nous nous sommes attachés à décrire l'impact de la lumière sur les deux premiers processus.

4-1. Etude de l'organogenèse au sein du bourgeon axillaire au cours du débourrement en conditions permissives

Après décapitation (T0), un bourgeon distal de *Rosa hybrida* 'Radrazz' est constitué en moyenne de 8,47 ± 0,74 pièces foliaires (primordia, feuilles préformées et écailles, Figure 33). En conditions permissives du débourrement (lumière blanche 200 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, 16h/24h), l'organogenèse est rapidement induite suite à la décapitation : après 24 h de culture, le nombre moyen de pièces foliaires par bourgeon a, en effet, significativement augmenté (Figure 33). L'organogenèse se poursuit et, au bout de 72 h, trois nouveaux primordia foliaires sont généralement produits, comme on peut l'observer sur des coupes transversales de bourgeons distaux (Figure 34A). Après 7 jours de culture sous lumière blanche, on dénombre en moyenne 12,10 ± 1,12 pièces foliaires par bourgeon (Figure 33, T7). Un mois après la décapitation, l'axe issu du débourrement du bourgeon distal fleurit et sa croissance est terminée. Le nombre de pièces foliaires (écailles et feuilles) le long de cet axe est alors en moyenne de 12,44 ± 1,15 (Figure 35). Cette valeur n'est pas statistiquement différente de celle observée au sein du bourgeon distal 7 jours après décapitation. Ainsi, après décapitation, l'activité organogénique du méristème est rapidement induite et l'ensemble des pièces foliaires est totalement mis en place dans les 7 jours suivants.

4-2. Effet de l'intensité lumineuse

L'impact de différentes intensités lumineuses sur les composantes du débourrement a été étudié afin d'observer s'il existait un seuil d'intensité lumineuse minimal nécessaire au débourrement et s'il existait une variabilité génétique au sein des six variétés de rosiers étudiées.

4-2-1. Sur le débourrement

Pour les six cultivars testés, les pourcentages de débourrement des bourgeons distaux augmentent avec l'intensité lumineuse (Figure 36) et atteignent la valeur de 100% pour la valeur de flux de photons la plus élevée (200 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$). Il est intéressant d'observer que les valeurs les plus faibles de flux de photons testés (2 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) permettent le débourrement des bourgeons distaux, pour tous les cultivars, alors qu'aucun débourrement n'est observé à l'obscurité.

La variabilité génotypique entre les six variétés est mise en évidence lors des expériences réalisées sous les faibles flux de photons. Ainsi, *Rosa hybrida* 'Radrazz' et 'Meiprille' constituent les deux variétés les plus sensibles aux conditions lumineuses puisque seulement 50% des bourgeons sont aptes à débourrer sous une lumière blanche d'une intensité de 2 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, alors que des valeurs supérieures à 80% sont obtenues pour les quatre autres cultivars sous cette même condition lumineuse (Figure 36).

4-2-2. Sur la croissance des feuilles préformées

Après 12 jours de culture sous une forte valeur de flux de photons (200 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$), en moyenne deux à quatre feuilles se sont épanouies hors des écailles des bourgeons axillaires distaux (Figure 37). Au contraire, après 12 jours de culture sous des valeurs de flux de photons plus faibles (2 et 20 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$), seule une feuille, en moyenne, a pu être observée hors des écailles (Figure 37). Ce profil est observé pour tous les cultivars.

Rosa hybrida 'Meiprille' apparaît une nouvelle fois comme la variété la plus sensible aux conditions lumineuses : elle présente un nombre de feuilles visibles hors des écailles (2,26 ± 0,81 ; Figure 37) significativement inférieur à celui observé chez les autres cultivars (plus de trois feuilles visibles).

4-2-3. Sur l'activité organogénique du méristème apical caulinaire

L'influence de l'intensité lumineuse sur l'activité organogénique du méristème apical des bourgeons distaux a été étudiée chez trois variétés (*Rosa hybrida* 'Radrazz', *Rosa hybrida*

'Meiprille' et *Rosa wichurana* 'Basye's thornless') sous des valeurs croissantes de flux de photons (0, 2, 20 et 200 µmol.m^{-2}.s^{-1}).

Après 7 jours de culture à l'obscurité ou sous une faible valeur de flux de photons (2 µmol.m^{-2}.s^{-1}), l'organogenèse est inhibée pour deux des trois cultivars étudiés (*Rosa hybrida* 'Radrazz' et *Rosa wichurana* 'Basye's thornless') (Figure 38). L'absence d'organogenèse au sein du bourgeon peut être observée dès 3 jours après décapitation (Figure 34B) où, contrairement à ce qui est observé sous lumière blanche (Figure 34A), aucun nouveau primordium n'est visible.

Sous de plus fortes valeurs de flux de photons, l'activité organogénique du méristème apical caulinaire s'accroît avec l'intensité lumineuse et le plus grand nombre de primordia foliaires produits est observé lorsque les plantes sont cultivées sous une valeur de flux de photons de 200 µmol.m^{-2}.s^{-1} (Figure 38).

4-2-4. Sur l'état hydrique du bourgeon axillaire et du nœud associé au cours du débourrement

4-2-4-1. Variation du poids frais des bourgeons axillaires distaux et des nœuds associés

Chez *Rosa hybrida* 'Radrazz', le poids frais moyen d'un bourgeon distal a été mesuré juste après décapitation (T0) et après 24, 48, 72 et 96 h de culture sous lumière blanche (200 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h) ou à l'obscurité. Les résultats sont présentés Figure 39. A la lumière, une augmentation significative du poids frais moyen d'un bourgeon est observée dès 72 h après décapitation. Cette augmentation s'intensifie et le poids du bourgeon a, en moyenne, triplé 96 h après décapitation. Ce résultat est en adéquation avec la croissance importante des feuilles hors du bourgeon. Au contraire, à l'obscurité, seule une légère augmentation du poids frais moyen a lieu après décapitation et peut être corrélée au léger gonflement visible suite à la décapitation. Le poids frais du bourgeon augmente très peu tout au cours du traitement, ce qui est en accord avec l'absence d'organogenèse au sein du méristème et avec la croissance réduite des primordia foliaires à l'obscurité.

Des mesures du poids frais ont également été conduites sur la portion de nœud portant ce bourgeon axillaire distal. Le poids frais moyen d'un nœud est relativement stable au cours du temps, que ce soit en condition d'éclairement ou d'obscurité : il est, en moyenne, de 84,38 ± 10,58 mg. La lumière ne semble donc pas provoquer une augmentation de matière fraîche au sein du nœud au cours du débourrement, comme c'est le cas pour le bourgeon.

4-2-4-2. Estimation de la matière sèche et de la quantité d'eau

La lyophilisation de bourgeons et de nœuds a permis d'estimer le poids de matière sèche et la quantité d'eau par organe. Ainsi, l'impact de la lumière sur la croissance et l'état d'hydratation des organes a pu être étudié. Bien que l'expérience n'ait été réalisée que sur un seul lot biologique, les fortes variations observées fournissent de bonnes indications quant à l'état d'hydratation de l'organe étudié.

Après 24 h de culture à la lumière, le poids sec d'un bourgeon axillaire distal augmente rapidement et est multiplié par cinq dès 96 h après décapitation (Figure 40A), ce qui est corrélé à la croissance visible des premiers primordia foliaires. Au contraire, à l'obscurité, seule une légère variation du poids sec du bourgeon est observée pendant la même période. Concernant le nœud, son poids sec varie très peu au cours du temps et de façon similaire à la lumière et à l'obscurité (Figure 40B).

Si l'on considère la quantité d'eau par organe, on observe qu'au moment de la décapitation, le bourgeon ne contient qu'une très faible quantité d'eau (Figure 41). Suite à la décapitation et en présence de lumière, une forte augmentation de la quantité d'eau par bourgeon a lieu. A l'obscurité, au contraire, la quantité d'eau augmente légèrement après la décapitation et reste stable, même après 96 h de traitement (Figure 41). Au niveau du nœud, aucune variation de la quantité d'eau n'a été mesurée, que ce soit à la lumière ou à l'obscurité.

4-3. Effet de la qualité de la lumière

4-3-1. Sur le débourrement

Lorsque les plantes expérimentales sont cultivées pendant 12 jours sous lumière bleue ou rouge clair, des débourrements des bourgeons distaux sont observés chez les six cultivars testés (Tableau VI).

La lumière bleue est aussi efficace que la lumière blanche, à flux de photons égal (200 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$), pour promouvoir le débourrement. Pour les deux conditions, le taux de débourrement atteint 100% pour chacune des variétés étudiées.

La lumière rouge clair semble moins efficace que la lumière blanche, à flux de photons égal (20 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$). Quelle que soit la variété considérée, des taux de débourrement plus faibles sont observés en lumière rouge clair. Une nouvelle fois, la variabilité génotypique existante entre les six variétés est mise en évidence : *Rosa hybrida* 'Meiprille' se révèle être la

variété la plus exigeante en terme de qualité de la lumière. En effet, cette variété est la seule à présenter, sous lumière rouge clair, un taux de débourrement avoisinant les 50 % alors que les autres variétés présentent des taux de débourrement tous supérieurs à 70 %.

Des plantes expérimentales *Rosa hybrida* 'Radrazz' ont été exposées à la lumière rouge sombre (2,7 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) pendant 12 jours (Tableau VII). Alors que sous lumière blanche, pour une valeur de flux de photons égale, le débourrement des bourgeons distaux est observé, aucun débourrement n'a lieu en présence de lumière rouge sombre. Néanmoins, un gonflement des bourgeons similaire à celui observé après 12 jours d'obscurité se produit.

4-3-2. Sur la croissance des feuilles préformées

Après 12 jours de culture en présence de lumière bleue ou de lumière rouge clair, les bourgeons axillaires distaux des plantes expérimentales appartenant aux six variétés présentent des feuilles visibles hors des écailles. Ceci met en évidence la capacité de ces qualités lumineuses à permettre, seules, la croissance des jeunes feuilles (Figure 42). Le nombre de feuilles visibles hors des écailles des bourgeons distaux a été déterminé pour chaque condition lumineuse et comparé au développement foliaire observé en lumière blanche, à flux de photons égal.

Pour quatre des six cultivars, la lumière bleue est aussi efficace que la lumière blanche. Pour *Rosa hybrida* 'Meiprille' et 'Meichibon', une croissance moins importante des primordia foliaires est observée sous lumière bleue (Figure 42A).

La croissance des primordia foliaires observée sous lumière rouge est identique à celle observée en lumière blanche, pour cinq des six cultivars. Chez *Rosa chinensis* 'Old blush', cette croissance est même plus importante sous lumière rouge clair (Figure 42B).

4-3-3. Sur l'activité organogénique du méristème apical caulinaire

L'influence de trois qualités lumineuses, i.e. lumière bleue (200 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$), lumière rouge clair (20 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) et lumière rouge sombre (2,7 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$), sur l'activité organogénique du méristème a été mesurée chez trois variétés (*Rosa hybrida* 'Radrazz', *Rosa hybrida* 'Meiprille' et *Rosa wichurana* 'Basye's thornless').

Le nombre de pièces foliaires (primordia, feuilles préformées et écailles) après 7 jours de culture sous lumière bleue est significativement supérieur à celui mesuré juste après décapitation (T0) (Figure 43A). La lumière bleue favorise donc l'organogenèse et ceci de manière aussi efficace que la lumière blanche, à flux de photons égal. Chez *Rosa wichurana*

'Basye's thornless', la lumière bleue est même plus efficace que la lumière blanche pour promouvoir l'activité organogénique du méristème.

La lumière rouge clair favorise également l'organogenèse (Figure 43B), mais seulement pour deux des trois cultivars. Chez *Rosa hybrida* 'Radrazz', la lumière rouge clair est aussi efficace, pour une même valeur de flux de photons, que la lumière blanche. Chez *Rosa wichurana* 'Basye's thornless', la lumière rouge clair apparaît moins efficace que la lumière blanche. Enfin, chez *Rosa hybrida* 'Meiprille', la lumière rouge clair ne semble pas permettre l'organogenèse.

De manière étonnante, la lumière rouge sombre (Figure 43C) stimule l'organogenèse chez *Rosa hybrida* 'Radrazz' et *Rosa wichurana* 'Basye's thornless', alors qu'elle n'est pas observée en lumière blanche pour un même flux de photons. *Rosa hybrida* 'Meiprille' se comporte différemment des deux cultivars précédents puisque l'organogenèse n'est pas favorisée par la lumière rouge sombre.

4-4. Efficacités relatives des lumières bleue et rouge clair

Les expériences précédentes montrent que la lumière bleue et la lumière rouge clair favorisent le débourrement. Cependant, aucune comparaison directe ne peut être réalisée entre les deux qualités lumineuses, les expériences ayant été réalisées sous deux intensités lumineuses distinctes (200 et 20 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$). Aussi, afin de pouvoir réaliser cette comparaison, l'influence sur le débourrement et ses composantes de la lumière bleue à 20 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ (16h/24h) à été étudiée chez *Rosa hybrida* 'Radrazz'. Les résultats ont alors été comparés à ceux obtenus en lumière blanche et en lumière rouge clair à cette même intensité lumineuse.

4-4-1. Sur le débourrement

Après 12 jours de culture à 20 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, les trois qualités lumineuses testées permettent le débourrement des bourgeons distaux des plantes expérimentales (Tableau VIII).

Le pourcentage de débourrement le plus élevé est obtenu sous lumière blanche, où 100% des plantes expérimentales ont un bourgeon distal débourré. La lumière bleue est, quant à elle, moins efficace que la lumière rouge clair pour permettre le débourrement.

Il est intéressant de noter que le débourrement sous lumière bleue est, tout comme sous lumière blanche, fonction de l'intensité lumineuse. En effet, le pourcentage de débourrement

sous lumière bleue à 20 µmol.m^{-2}.s^{-1} (Tableau VIII) est inférieur à celui observé sous lumière bleue à 200 µmol.m^{-2}.s^{-1} (Tableau VI).

4-4-2. Sur la croissance des feuilles préformées

Les trois qualités lumineuses testées permettent, seules, à 20 µmol.m^{-2}.s^{-1}, la croissance des primordia foliaires (Figure 44). Après 12 jours de culture, des feuilles sont visibles hors des écailles des bourgeons axillaires distaux des plantes expérimentales. L'analyse statistique montre que les croissances des primordia foliaires sont identiques quelle que soit la qualité lumineuse considérée.

4-4-3. Sur l'activité organogénique du méristème apical caulinaire

Après 7 jours de culture sous l'une ou l'autre des trois qualités lumineuses testées, à 20 µmol.m^{-2}.s^{-1}, l'activité organogénique du méristème est favorisée (Figure 45). Le nombre de pièces foliaires (primordia, feuilles préformées et écailles) au sein du bourgeon distal est alors significativement différent de celui mesuré juste après décapitation (T0), et ceci quelque soit la qualité lumineuse considérée. La lumière bleue est plus efficace que les deux autres qualités lumineuses pour favoriser l'organogenèse. La lumière blanche et la lumière rouge clair sont, quant à elles, aussi efficaces l'une que l'autre.

5. Discussion

5-1. Le besoin absolu de lumière pour le débourrement n'est pas une règle générale chez les plantes

La lumière est un des facteurs environnementaux qui régulent le débourrement des bourgeons axillaires chez plusieurs espèces (espèces ligneuses, Niinemets & Lukjanova, 2003 ; *Vaccinium hirtum*, Kawamura & Takeda, 2004 ; *Triticum aestivum*, Evers *et al.*, 2006) dont le rosier (Healy & Wilkins, 1980 ; Mor & Halevy, 1980 ; Mor *et al.*, 1980 ; Khayat & Zieslin, 1982 ; Bredmose, 1997). Chez *Rosa hybrida* 'Baccara', la lumière est absolument nécessaire au débourrement des bourgeons axillaires situés dans la partie basale des plantes (Zieslin & Mor, 1981). Nos résultats confirment cette observation chez six autres variétés de rosier, appartenant à trois espèces différentes, pour lesquelles aucun débourrement n'a été observé à l'obscurité (Figure 30, Tableau V). Bien que l'observation n'ait été faite que chez

trois espèces (sept variétés au total), ce qui est peu puisque le genre *Rosa* comporte près de cent cinquante espèces, on peut tout de même penser que le besoin de lumière pour le débourrement chez le rosier caractérise ce genre. Le besoin absolu de lumière pour le débourrement des bourgeons ne constitue toutefois pas une règle générale chez les plantes, comme nous avons pu le montrer. En effet, les expériences réalisées chez la tomate (*Solanum lycopersicum* L. 'Tresor' hybrid F1), le peuplier (*Populus tremula* x *Populus tremuloïdes* L.) ou *Arabidopsis thaliana*, plantes appartenant à des genres différents, montrent que le débourrement des bourgeons axillaires a lieu à l'obscurité (Figure 31), tout comme la croissance de la tige issue du bourgeon. Ainsi, le contrôle par la lumière du débourrement serait différent en fonction du genre. De par son besoin absolu de lumière, le rosier constitue donc un modèle très intéressant pour l'étude des voies de signalisation de la lumière conduisant au débourrement des bourgeons.

5-2. Les bourgeons sont les organes percepteurs de la lumière utile au débourrement

Lorsque seul le bourgeon axillaire distal de nos plantes expérimentales est exposé à la lumière, le débourrement a lieu ainsi que la croissance de la tige (jusqu'à floraison). Inversement, lorsque ce bourgeon est placé à l'obscurité et que le reste de la plante est illuminé, le bourgeon ne débourre pas (Figure 32). Ces résultats mettent en évidence que la tige ne contribue pas à la perception ni à la transduction du signal lumineux utiles au débourrement. La lumière est perçue par le bourgeon lui-même et la voie de signalisation de la lumière permettant le débourrement semble être localisée au sein de cette entité.

Néanmoins, on peut se demander comment le méristème et les primordia foliaires peuvent, alors qu'ils sont enfouis sous les écailles, percevoir le signal lumineux. Des analyses immunochimiques réalisées sur les différents territoires du bourgeon (écailles, primordia foliaires et méristème), comme celles conduites chez les graines ou les jeunes tiges d'avoine (*Avena sativa* L. : Tokuhisa *et al.*, 1985 ; Cordonnier *et al.*, 1986), permettraient de comprendre la distribution spatiale des photorécepteurs au sein du bourgeon et de faire un premier pas dans la compréhension de la transmission du signal lumineux vers le méristème et les pièces foliaires préformées.

5-3. L'intensité du photocontrôle du débourrement chez *Rosa sp.* varie avec le génotype

En comparant les comportements des espèces de rosier sous les différentes conditions lumineuses testées, nous avons pu montrer que le débourrement dépendait de l'intensité et de la qualité lumineuse, pour chacune des trois espèces de rosiers étudiées (Tableaux V et VI, Figures 33 et 34).

L'ensemble des six variétés étudiées réagissent de la même façon sous les différentes conditions lumineuses testées. Néanmoins, parmi ces six variétés, *Rosa hybrida* 'Meiprille' apparait comme le cultivar le plus exigeant en intensité lumineuse, notamment pour ce qui concerne la croissance des feuilles préformées (Figure 34). C'est également la variété la plus sensible à la qualité lumineuse : sous lumière rouge clair, le taux de débourrement est inférieur à celui observé chez les autres espèces (Tableau VI) et il n'y a aucune activité organogénique au sein du méristème sous ces longueurs d'ondes (Figure 43B). Ces résultats suggèrent l'existence d'une variabilité génétique au sein des loci impliqués dans le photocontrôle du débourrement chez le rosier. Aucune étude de variabilité génétique n'a encore été réalisée sur ce processus. Une telle étude pourrait mettre en évidence l'implication relative de loci et d'allèles différents en réponse à des intensités et des qualités lumineuses différentes. Cela a été récemment étudié chez les graines d'*Arabidopsis thaliana* où la germination, contrôlée par la lumière, peut être induite par deux voies de signalisation différentes en fonction du type d'exposition lumineuse perçue par les graines (Laserna *et al*., 2008). Or, une variabilité génétique entre différentes accessions a été mise en évidence au sein des loci impliqués dans chacune de ces voies de signalisation. Une telle stratégie pourrait ainsi contribuer à la sélection de génotypes de rosier, plus ou moins sensibles aux conditions lumineuses.

5-4. L'afflux d'eau et la croissance des tissus au cours du débourrement sont sous contrôle lumineux

Chez *Rosa hybrida* 'Radrazz', la forte augmentation du poids frais du bourgeon, aussitôt la décapitation de la tige, mesurée en présence de lumière (Figure 39) est le résultat de plusieurs processus : la croissance des tissus préformés et l'organogenèse (Figures 33 et 34), provoquant une forte et rapide augmentation du poids sec du bourgeon (Figure 40A). A cela s'ajoute l'augmentation rapide de la quantité d'eau au sein du bourgeon (Figure 41), eau nécessaire à ces processus de croissance. Au contraire, à l'obscurité, seules de faibles

augmentations du poids sec du bourgeon et de la quantité d'eau sont mesurées dans les premières 24 h suivant la décapitation (Figures 39 et 40A). Ceci se traduit par un léger gonflement du bourgeon visible à l'œil nu. Dans les jours qui suivent, aucune variation n'est enregistrée, suggérant que l'absence de lumière provoque un blocage de l'afflux d'eau nécessaire à la croissance.

Ainsi, il semble qu'il existe une bonne corrélation entre le niveau d'hydratation du bourgeon et sa capacité de croissance. Il est vraisemblable qu'un état d'hydratation plus élevé confère au bourgeon un état biologique favorable à la croissance, notamment en régulant la turgescence cellulaire. Plusieurs travaux ont pu mettre en évidence une telle augmentation d'eau au sein des bourgeons juste avant le débourrement. Cottignies (1983, 1987) a ainsi pu mesurer, dans les bourgeons de frêne (*Fraxinus excelsior* L.), une augmentation de plus de 15% de la teneur en eau juste avant le débourrement. Bien que notre modèle d'étude soit différent, on peut toutefois observer une telle augmentation de la teneur en eau. Lors des vingt-quatre premières heures et en présence de lumière, une augmentation de 14,5% de la teneur en eau est mesurée au sein du bourgeon. Après 96 h de lumière, lorsque le bourgeon est débourré, cette augmentation est alors supérieure à 800%. Ollier (1993) a également pu observer une augmentation d'eau au sein des bourgeons de noyer (*Juglans regia* L.) et en a conclut que les bourgeons qui débourraient étaient toujours les bourgeons les plus hydratés. Les observations faites sur rosiers vont dans ce sens, et révèlent l'impact des conditions de lumière sur cet afflux d'eau.

Deux hypothèses peuvent être envisagées sur l'origine de l'eau arrivant jusqu'au bourgeon. Selon la première, l'eau proviendrait des réserves hydriques des nœuds supportant les bourgeons distaux. Nos expériences, réalisées au niveau des nœuds portant les bourgeons axillaires distaux, indiquent que les poids frais et secs (Figure 40B) ainsi que la quantité d'eau par nœud sont sensiblement identiques pendant toute la durée du traitement, que ce soit à la lumière ou à l'obscurité. Ceci suggère qu'il n'y a pas de diminution des teneurs en eau dans les nœuds au profit des bourgeons pendant le débourrement, et que ces nœuds ne constituent pas la source en eau nécessaire au débourrement. Ces nœuds ne constitueraient donc qu'un lieu de transit de l'eau vers les bourgeons. Selon la seconde hypothèse, un flux d'eau provenant des parties basales de la plante grâce à la poussée racinaire, alimenterait la partie distale de la tige décapitée: ceci se traduit par la formation d'une goutte de sève sur la surface coupée de la tige. La présence de lumière autoriserait alors l'afflux d'eau vers le bourgeon au travers de mécanismes sous photocontrôle.

5-5. Le débourrement est fonction de l'intensité lumineuse mais est permis par des intensités lumineuses faibles

Pour les six variétés de rosier étudiées, le débourrement est corrélé à l'intensité lumineuse (Figure 33) : plus les valeurs de flux de photons perçues sont élevées, plus le pourcentage de débourrement est élevé. Ce résultat est en accord avec les observations faites par Zieslin & Mor (1981) chez des rosiers *Rosa hybrida* 'Mercedes' soumis à des valeurs décroissantes de flux de photons (de 430 à 90 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$).

Il est également intéressant de noter que, bien que le besoin de lumière soit absolu pour observer le débourrement des bourgeons axillaires, une faible intensité (2 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) est suffisante pour permettre le débourrement. Les processus clés du débourrement apparaissent donc être très sensibles aux conditions lumineuses.

Dans notre cas, on peut s'interroger sur le type de réponse induite par les photorécepteurs : s'agit-il d'une VLFR (Very Low Fluence Response), d'une LFR (Low Fluence Response) ou d'une HIR (High Irradiance Response) ? Bien qu'une intensité lumineuse de 2 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ puisse paraître faible, il semblerait qu'elle soit suffisante pour induire une réponse de type HIR (Casal *et al.*, 1998). En effet, les deux premiers types de réponses sont observés lors de flashs lumineux courts, répétés ou non, à des intensités lumineuses inférieures à 1 $\mu mol.m^{-2}$ (Furuya & Schäfer, 1996 ; Batschauer, 1999). Toutefois, sur de longues durées d'éclairement comme dans notre cas (16h/24h), la réponse engendrée est généralement considérée comme une réponse de type HIR, et ceci quelle que soit l'intensité de l'éclairement (Casal *et al*., 1998).

5-6. Les lumières rouge clair et bleue déclenchent le débourrement, contrairement à la lumière rouge sombre

Des débourrements ont été observés sous lumière rouge clair (ratio Rc/Rs = 20,27) pour les six cultivars étudiés (Tableau VI). Chez *Rosa hybrida* 'Radrazz', aucun débourrement n'est observé sous lumière rouge sombre (ratio Rc/Rs = 0,25) (Tableau VII). Chez le blé, la production de tiges axillaires est inhibée pour des ratios Rc/Rs inférieurs à 0,35 (Evers *et al.*, 2006). La lumière rouge clair seule serait donc suffisante chez le rosier pour permettre le débourrement, comme chez l'aubépine (*Crateagus oxyacantha*) et différents cultivars de rhododendrons (*Rhododendron sp*., Marks & Simpson, 1990). La lumière rouge sombre,

quand à elle, inhibe le débourrement. Ce processus avait été précédemment observé chez un autre cultivar de rosier (*Rosa hybrida* 'Baccara', Healy & Wilkins, 1980).

Nos résultats montrent, pour la première fois chez le rosier, que la lumière bleue permet le débourrement des bourgeons axillaires (Tableau VI). L'impact de la lumière bleue sur le débourrement n'a été que très peu étudié et, à notre connaissance, une seule étude traite ce sujet. Cette étude porte sur une autre Rosacée, *Prunus cerasifera* L., chez laquelle la lumière bleue favorise également le débourrement (Muleo *et al.*, 2001). On peut également noter l'étude de l'impact positif de la lumière bleue sur le tallage du blé (Barnes & Bugbee, 1992). Cependant, chez *Rosa hybrida* 'Radrazz', nos résultats montrent que, pour une même intensité lumineuse (20 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$), la lumière rouge clair est plus efficace que la lumière bleue pour favoriser le débourrement (Tableau VIII).

5-7. L'activité organogénique du méristème et la croissance des feuilles préformées sont régulées par l'intensité et la qualité lumineuses

Le débourrement est le résultat de trois processus physiologiques : l'organogenèse au sein du méristème apical, la croissance des feuilles préformées et l'élongation des entre-nœuds. Deux de ces processus, organogenèse et croissance des feuilles préformées, ont été étudiés afin de déterminer s'ils étaient sous contrôle lumineux.

Concernant l'impact de l'intensité lumineuse, il a été montré que des débourrements étaient observés sous de faibles et moyennes valeurs de flux de photons (2 et 20 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, Figure 33). Cependant, nous avons pu noter que les débourrements observés sous ces deux intensités lumineuses n'étaient pas équivalents. Ainsi, sous une faible intensité lumineuse, le débourrement implique principalement la croissance des primordia puisque seule une faible, voire nulle chez *Rosa hybrida* 'Radrazz', activité organogénique au sein du méristème a été mesurée (Figures 34 et 38). Sous une intensité lumineuse moyenne, organogenèse et croissance des primordia foliaires ont lieu et contribuent au débourrement (Figures 34 et 38). Ainsi, ces deux composantes du débourrement ne requièrent pas les mêmes seuils d'intensité lumineuse : l'induction de l'organogenèse nécessite des flux de photons plus importants que ceux permettant la croissance des feuilles préformées.

Dans la bibliographie, aucune étude n'a été menée sur l'impact de la lumière sur l'activité organogénique du méristème ou la croissance des feuilles préformées à l'intérieur des bourgeons. La grande majorité des études concernant l'activité organogénétique du méristème apical caulinaire porte sur le déroulement même de ce processus, et non sur l'impact d'un

facteur environnemental (Fleming, 2006). Nos résultats montrent pour la première fois que l'activité organogénique du méristème est limitée, voire inhibée, en absence de lumière et stimulée par des intensités lumineuses croissantes (Figure 38). L'organogenèse est également stimulée par les lumières bleue et rouge clair (Figures 43 A-B). Chez *Rosa hybrida* 'Radrazz', pour une même valeur de flux de photons, la lumière bleue stimule plus fortement l'activité organogénique que la lumière rouge clair (Figure 45). La lumière rouge sombre a, quant à elle, des effets différents selon les cultivars (Figure 43C) : l'organogenèse peut être inhibée, comme chez *Rosa hybrida* 'Meiprille' et *Rosa wichurana* 'Basye's thornless' ou maintenue, comme chez *Rosa hybrida* 'Radrazz'. Cependant, dans ce dernier cas, l'activité organogénique du méristème reste faible.

La croissance des feuilles préformées, la seconde composante du débourrement étudiée, nécessite de la lumière et est favorisée par des intensités lumineuses croissantes (Figure 37). En comparant ces résultats avec ceux obtenus lors d'études de la croissance des feuilles épanouies après le débourrement (Niinemets *et al.*, 1998 ; Granier & Tardieu, 1999 ; Van Volkenburgh, 1999), il apparaît que les jeunes feuilles préformées se comportent, sous des faibles intensités lumineuses, comme le limbe de feuilles épanouies. En effet, les feuilles épanouies soumises à l'obscurité présentent un syndrome d'évitement de l'ombre pour lequel il est décrit une réduction de l'expansion du limbe foliaire (Tsukaya, 2005). Au contraire, sous des fortes intensités lumineuses, le phénomène inverse est observé et la surface du limbe foliaire est augmentée. De la même façon, sous lumières bleue et rouge clair, les jeunes feuilles préformées de rosier (Figures 42 et 44) se comportent comme les limbes des feuilles épanouies d'*Arabidopsis thaliana* et leur croissance est stimulée (Kozuka *et al.*, 2005).

5-8. Identification du ou des photorécepteurs impliqués dans la perception de la lumière utile au débourrement

Nos résultats montrent que, pour les six cultivars étudiés, la lumière rouge clair permet le débourrement (Tableaux II et IV), favorise la croissance des feuilles préformées (Figures 42B et 44) et l'activité organogénique du méristème (Figures 43B et 45). L'inhibition du débourrement par la lumière rouge sombre et de l'organogenèse chez *Rosa hybrida* 'Radrazz' (Tableau VII, Figure 43C) suggèrent l'implication des phytochromes. En effet, une telle réponse Rc/Rs réversible est caractéristique d'un contrôle par les phytochromes (Nagy & Schaffer, 2002 ; Rockwell *et al.*, 2006) et pourrait suggérer leur implication dans le photocontrôle du débourrement. Chez le peuplier (*Populus trichocarpa*), cette hypothèse a

également été suggérée suite à la co-localisation du gène codant pour le phytochrome B avec plusieurs QTLs associés au débourrement (Howe *et al.*, 1998). On note également le rôle du phytochrome B dans la régulation du débourrement des bourgeons axillaires du sorgho (*Sorghum bicolor*) via la régulation du gène *SbTB1*, gène impliqué dans le contrôle du débourrement (Kebrom *et al*., 2006). Il semble donc que les phytochromes jouent un rôle important dans la photoperception de la lumière utile au débourrement, et l'impact des lumières rouge clair et rouge sombre chez le rosier suggère fortement leur implication dans ce genre.

Pour la première fois, nous avons pu montrer que la lumière bleue favorisait le débourrement des bourgeons axillaires chez six variétés de rosier appartenant à trois espèces (Tableaux VI et VIII). Concernant la réponse à la lumière bleue, plusieurs photorécepteurs peuvent être impliqués : les cryptochromes, les phototropines mais également les phytochromes (Kendrick & Kronenberg, 1994 ; Lin, 2002). Parmi ces trois types de photorécepteurs, les cryptochromes et les phytochromes sont les plus impliqués dans la photomorphogenèse (Jiao *et al.*, 2007), le rôle des phototropines dans ce processus n'étant pas encore clairement identifié (Folta & Spalding, 2001 ; Ohgishi *et al.*, 2004).

Les lumières bleue et rouge clair permettant le débourrement, différentes hypothèses peuvent être formulées concernant l'implication des photorécepteurs dans ce processus :

(1) seuls les phytochromes sont impliqués. En effet, ces photorécepteurs perçoivent principalement la lumière rouge, mais également la lumière bleue (Lin, 2002). Ils pourraient donc être, via une même voie de signalisation, à l'origine du débourrement observé sous ces deux conditions lumineuses.

(2) les cryptochromes et/ou les phototropines interviennent lors de la réponse à la lumière bleue. Deux voies de signalisation différentes permettraient ainsi d'aboutir au débourrement sous les deux qualités lumineuses.

Des résultats obtenus chez des mutants *d'Arabidopsis thaliana* des cryptochromes et des phototropines vont à l'encontre de la première hypothèse. En effet, il a été observé que, lors de processus photomorphogéniques tels que l'expansion des cotylédons, la lumière bleue perçue par les phytochromes n'était pas à l'origine de la réponse physiologique observée (Ohgishi *et al.*, 2004). Les travaux de Muleo & Morini (2008), menés sur le débourrement des bourgeons axillaires de jeunes tiges de pommier (*Malus domestica*) cultivées *in vitro*, suggèrent au contraire l'implication des phytochromes lors de la réponse à la lumière bleue. Cependant, des études supplémentaires seraient nécessaires pour affirmer que les

cryptochromes le sont également. Néanmoins, l'absence de mutants chez cette espèce limite, à l'heure actuelle, les conclusions de cette étude.

Ainsi, dans le cas du débourrement des bourgeons axillaires, aucun résultat ne permet, à l'heure actuelle, de conclure sur l'implication d'un ou plusieurs photorécepteurs. Au contraire d'*Arabidopsis thaliana* ou du sorgho (*Sorghum bicolor*), espèces chez lesquelles il existe de nombreux mutants des photorécepteurs (Devlin *et al*., 1999 ; Kebrom *et al*., 2006), aucun mutant n'est disponible chez le rosier et l'identification de l'implication d'un seul photorécepteur est par conséquent difficile.

Enfin, nos résultats indiquent que l'activité organogénique du méristème ne requiert pas les mêmes intensités lumineuses que la croissance des feuilles préformées pour être stimulée. On peut alors s'interroger sur les voies de signalisation des différents photorécepteurs favorisant l'un ou l'autre de ces processus : existe-t-il une voie de signalisation unique ou, au contraire, plusieurs voies de signalisation conduisant à la mise en place de ces processus ? A l'heure actuelle, aucune étude n'a répondu à cette interrogation.

Chapitre II

Etude du photocontrôle du métabolisme glucidique du bourgeon au cours du débourrement

Chapitre II. Etude du photocontrôle du métabolisme glucidique du bourgeon au cours du débourrement

L'implication du métabolisme glucidique au cours du débourrement a été montrée chez de nombreuses espèces. Aussi, il nous a paru pertinent de nous intéresser à ce métabolisme et à son éventuel photocontrôle lors du débourrement du bourgeon de rosier.

1. Etude du métabolisme glucidique lié au sorbitol

Le rosier étant une Rosacées et le sorbitol étant un sucre d'importance majeure chez plusieurs espèces de cette famille, il nous a paru pertinent de nous intéresser au métabolisme glucidique lié à ce polyol et à son photocontrôle.

1-1. Dosage du sorbitol au cours du débourrement

Le dosage du sorbitol a été réalisé par HPLC sur des bourgeons et des nœuds de plantes expérimentales *Rosa hybrida* 'Radrazz' placées à la lumière blanche (200 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, 16h/24h) ou à l'obscurité, pendant 24 à 96 h.

Aucune trace de sorbitol n'a pu être détectée dans aucun de nos échantillons, comme le montre la Figure 46. Sur le chromatogramme, aucun pic n'apparait pour un temps de rétention de 25 min, identifié précédemment comme étant le temps de rétention du sorbitol.

1-2. Activité de l'enzyme NAD-SDH

Bien qu'il semble que le sorbitol ne soit que peu ou pas présent au sein des bourgeons et des nœuds, l'activité d'une enzyme de dégradation de cette molécule, la sorbitol déshydrogénase NAD-dépendante (NAD-SDH), est détectée au cours du débourrement. Dans les bourgeons, une activité de 960 $\mu mol.min^{-1}.g^{-1}$ de protéines est détectée au moment de la décapitation. Cette activité reste stable pendant 96 h et aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les conditions lumière et obscurité (Figure 47).

1-3. Evolution de l'expression génique d'une NAD-SDH

Grâce à une séquence nucléique disponible dans la base de données GenBank (BI977417) codant une NAD-SDH de rosier, nous avons pu détecter son expression dans les bourgeons et

étudier les variations d'expression génique de cette NAD-SDH au cours du temps et en fonction des conditions lumineuses.

1-3-1. Lumière blanche vs obscurité

L'expression génique de la NAD-SDH en présence de lumière blanche (200 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h) est significativement différente de celle mesurée à l'obscurité et ceci dès 6 h après la décapitation (Figure 48A). A la lumière, une diminution de l'expression génique est observée : celle-ci est maintenue pendant toute la durée du traitement (Figure 48B). Au contraire, à l'obscurité, l'expression génique est doublée après 24 h de traitement puis multipliée par 10 après 48 h. Cette stimulation de l'expression génique à l'obscurité est observée jusqu'à la fin du traitement (Figure 48B).

1-3-2. Effet de l'intensité lumineuse

L'impact de différentes intensités de lumière blanche (0, 2, 20 et 200 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h) a été mesuré 72 h après décapitation. Les résultats sont présentés Figure 48C. Des niveaux d'expressions géniques similaires sont obtenus sous les trois intensités lumineuses testées. Cependant, en présence de lumière blanche, l'expression génique est beaucoup moins importante qu'à l'obscurité.

1-3-3. Effet de la qualité lumineuse

Après 72 h de culture sous différentes qualités lumineuses (blanc, bleu, rouge clair) à 20 µmol.m^{-2}.s^{-1} (16h/24h), l'expression génique est stimulée en présence de lumière bleue ou de lumière rouge clair (Figure 48D). Ces deux qualités lumineuses, à intensité égale, permettent une expression génique légèrement plus élevée que sous lumière blanche.

2. Etude du métabolisme du saccharose

2-1. Evolution des quantités de Saccharose, de Glucose, de Fructose et d'Amidon au cours du débourrement

Les dosages du saccharose, du glucose, du fructose et de l'amidon ont été réalisés, par voie enzymatique, sur des bourgeons et des nœuds de plantes expérimentales placées à la lumière blanche (200 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h) ou à l'obscurité, pendant 24 à 96 h.

Des différences significatives ont été mesurées pour le saccharose, le glucose et l'amidon, selon les conditions d'éclairement. Le fructose n'est présent, quant à lui, qu'en très faibles quantités et aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les plantes placées à la lumière et celles placées à l'obscurité.

2-1-1. Teneurs en Saccharose et en Glucose

2-1-1-1. Au sein des bourgeons

Suite à la décapitation, la quantité de saccharose au sein du bourgeon diminue fortement, que ce soit en condition lumière ou obscurité (Figure 49A). Puis, en fonction du traitement lumineux appliqué, deux évolutions différentes sont observées. En présence de lumière, la quantité de saccharose ré-augmente de façon significative après 48 h de traitement et atteint une valeur 1,8 fois supérieure à celle mesurée juste après décapitation. Au contraire, à l'obscurité, aucune ré-augmentation n'est observée et la quantité de saccharose par bourgeon reste faible au cours du temps.

La quantité de glucose par bourgeon varie également en fonction des conditions d'éclairement (Figure 49B). Pendant les premières 48 h, les quantités de glucose mesurées à la lumière et à l'obscurité sont identiques et augmentent dans le bourgeon. Puis cette augmentation de la teneur en glucose s'intensifie en présence de lumière alors qu'elle reste stable à l'obscurité.

2-1-1-2. Au niveau des nœuds

L'évolution de la teneur en saccharose au niveau du nœud (Figure 49D) est identique à celle observée au niveau des bourgeons. Suite à la décapitation, la teneur en saccharose diminue à la lumière et à l'obscurité. Puis, en présence de lumière, une ré-augmentation est mesurée alors qu'au contraire, à l'obscurité, la teneur en saccharose reste faible.

En ce qui concerne l'évolution de la teneur en glucose dans le nœud, les profils obtenus pour les deux traitements sont assez identiques (Figure 49E). Suite à la décapitation, une forte diminution de la quantité de glucose est observée et celle-ci atteint une valeur cinq fois moins importante après 48 h de culture. Puis, pour les deux conditions lumineuses, une ré-augmentation, tendant vers des valeurs identiques à celles mesurées juste après décapitation, a lieu. Cette variation est cependant plus rapide à la lumière qu'à l'obscurité.

2-1-2. Teneur en Amidon

2-1-2-1. Au sein des bourgeons

Les quantités d'amidon mesurées au sein des bourgeons sont faibles (moins de 1 µg par bourgeon) et varient très peu au cours du temps ou en fonction de la condition lumineuse testée (Figure 49C). On note cependant une faible diminution des quantités d'amidon par bourgeon suite à la décapitation. Cette diminution se poursuit pendant toute la durée du traitement à l'obscurité. Au contraire, en présence de lumière, les teneurs en amidon ré-augmentent légèrement et atteignent la teneur mesurée juste après décapitation.

2-1-2-2. Au niveau des nœuds

Les mesures effectuées au niveau des nœuds révèlent des teneurs en amidon similaires pour les deux conditions lumineuses (Figure 49F). Une forte diminution (facteur 5) est observée pendant les premières 48 h suivant la décapitation puis ces valeurs restent stables pendant la durée restante des traitements.

2-2. Mesures d'activités d'enzymes impliquées dans la dégradation du saccharose

Les différences de quantités de saccharose et de glucose observées au sein des bourgeons et des nœuds entre les conditions lumière et obscurité suggèrent une régulation par la lumière du métabolisme glucidique. Les activités d'enzymes impliquées dans la dégradation du saccharose, les invertases acides vacuolaire (IAV) et pariétale (IAP), ont été étudiées au cours du débourrement. Les tests effectués n'ont pas permis de mesurer l'activité de la saccharose synthase (SUSY), autre enzyme de dégradation du saccharose.

2-2-1. Activités enzymatiques dans les bourgeons

Dès 24 h après décapitation, l'activité invertase acide vacuolaire (IAV) augmente significativement en présence de lumière (figure 50A) et a doublé au bout de 96 h. Au contraire, à l'obscurité, l'activité enzymatique est stable et on note une légère diminution après 96 h de traitement.

L'activité invertase acide pariétale (IAP) présente des profils similaires pour les deux conditions d'éclairement (Figure 50B) : suite à la décapitation, l'activité augmente faiblement pour atteindre un maximum après 48 h de traitement. Après 96 h de culture, l'activité a

diminué pour atteindre des valeurs identiques à celles mesurées à T0. Néanmoins, l'activité est alors légèrement plus élevée à la lumière qu'à l'obscurité.

2-2-2. Activités enzymatiques dans les nœuds

Suite à la décapitation, des augmentations des activités invertases acides vacuolaire (Figure 50C) et pariétale (Figure 50D) sont observées. Cependant, il est important de noter que, pour les temps tardifs, les mesures effectuées présentent de grandes variations inter-lots qui ne permettent pas la mise en évidence de valeurs statistiquement différentes. Ainsi, seules des différences ont été mesurées lors des 48 premières heures de traitement.

L'activité IAV augmente dès 24 h de traitement (Figure 50C) : l'augmentation est cependant plus forte à la lumière qu'à l'obscurité. Puis, que ce soit à la lumière ou à l'obscurité, l'activité IAV décroît pour atteindre des valeurs identiques à celle mesurée à T0.

On note également une augmentation de l'activité IAP suite à la décapitation (Figure 50D), pour les deux conditions lumineuses testées. Celle-ci est significativement différente après 48 h de traitement. Aucune différence significative n'est alors observée pendant le reste de la durée des traitements.

2-3. Etude de l'expression de gènes codant des enzymes du métabolisme glucidique au cours du débourrement

Les expressions de gènes codant une invertase acide vacuolaire (IAV) et une saccharose synthase (SUSY) ont été étudiées au sein du bourgeon distal, après décapitation. Cette étude a été réalisée au cours du temps et en présence de différents traitements lumineux. Dans un premier temps, les effets de la lumière blanche et de l'obscurité ont été testés. Puis les impacts respectifs du flux de photons et de la qualité lumineuse ont été évalués.

Cette étude a été réalisée par RT-PCR quantitative en temps réel, en se basant sur des séquences nucléiques disponibles dans la base de données GenBank (invertase acide vacuolaire : CF349730, saccharose synthase : EC587184).

2-3-1. Evolution de l'expression génique d'une invertase acide vacuolaire

2-3-1-1. Lumière blanche vs obscurité

Dès 24 h après la décapitation, des différences significatives entre l'expression du gène de l'IAV à la lumière et celle à l'obscurité apparaissent (Figure 51A). En condition lumière (200

µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h), l'expression génique de l'invertase acide vacuolaire augmente dès la décapitation et a triplé à la fin du traitement (96 h). Au contraire, à l'obscurité, une légère diminution de cette expression génique est mesurée. Cette diminution est transitoire puisque l'expression génique mesurée après 96 h d'obscurité redevient identique à l'expression génique mesurée à T0.

Des différences d'expression entre les deux traitements lumineux testés étant mesurées dès 24 h après la décapitation, l'expression génique a été étudiée plus précocement : 1, 6 et 10 h après décapitation (résultat non montré). Toutefois, aucune différence significative n'a été mise en évidence pour ces temps.

2-3-1-2. Effet de l'intensité lumineuse

L'impact de différentes intensités de lumière blanche (0, 2, 20 et 200 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h) a été mesuré 72 h après décapitation. Les résultats montrent que l'intensité lumineuse module l'expression génique de l'IAV (Figure 51B). Alors que celle-ci est faible à l'obscurité, elle est stimulée de façon plus importante pour les intensités faibles (2 µmol.m^{-2}.s^{-1}) et les intensités moyennes (20 µmol.m^{-2}.s^{-1}). De manière étonnante, elle est moins forte pour les fortes intensités lumineuses (200 µmol.m^{-2}.s^{-1}).

2-3-1-3. Effet de la qualité de la lumière

Après 72 h de culture sous différentes qualités lumineuses (blanc, bleu, rouge clair) à 20 µmol.m^{-2}.s^{-1} (16h/24h), l'expression génique de l'IAV a été mesurée. Les résultats (Figure 51C) montrent que la lumière bleue seule et la lumière rouge clair seule stimulent l'expression du gène codant pour l'IAV. De plus, la lumière rouge clair permet une expression plus forte que la lumière bleue. Il semblerait cependant que, sous l'action combinée des lumières rouge clair et bleue, composantes principales de la lumière blanche dans notre cas, l'expression soit plus fortement stimulée que sous une seule de ces qualités lumineuses.

2-3-2. Evolution de l'expression génique d'une saccharose synthase

2-3-2-1. Lumière blanche vs obscurité

En présence de lumière blanche (200 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h), l'expression génique de la saccharose synthase est stable au cours du temps (Figure 52A). Au contraire, l'expression génique diminue fortement à l'obscurité, dès 24 h après décapitation. Cette diminution

s'accentue les heures suivantes et l'expression génique se maintient à un niveau faible tout au long du traitement.

2-3-2-2. Effet de l'intensité lumineuse

Après 72 h sous différentes intensités de lumière blanche (0, 2, 20 et 200 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h), l'expression génique de la SUSY est modulée (Figure 52B). Alors que l'expression de la SUSY est faible à l'obscurité, elle est fortement stimulée par la lumière blanche. Comme pour l'IAV, les faibles intensités (2 µmol.m^{-2}.s^{-1}) et les moyennes intensités (20 µmol.m^{-2}.s^{-1}) stimulent plus fortement l'expression génique que les fortes intensités (200 µmol.m^{-2}.s^{-1}).

2-3-2-3. Effet de la qualité de la lumière

Après 72 h de culture sous différentes qualités lumineuses à 20 µmol.m^{-2}.s^{-1} (16h/24h), on constate à nouveau que les lumières rouge clair et bleue stimulent, seules, l'expression de ce gène codant pour la SUSY (Figure 52C). Cependant, à la différence de ce qui a été observé pour l'IAV, la combinaison de ces deux spectres dans la lumière blanche ne stimule pas davantage l'expression génique de la SUSY.

Afin d'obtenir une vue d'ensemble des résultats liés au métabolisme du saccharose, ces derniers ont été représentés de façon schématique dans la Figure 53.

3. Discussion

3-1. Rôle du métabolisme du sorbitol au cours du photocontrôle du débourrement du bourgeon de rosier

3-1-1. Le sorbitol n'est pas le sucre majoritairement transporté chez le rosier

Chez la plupart des arbres fruitiers appartenant à la famille des Rosacées, le sorbitol est le sucre le plus abondant et est celui majoritairement transporté (*Prunus persica* L., Lo Bianco *et al.*, 1999a,b ; *Malus domestica*, Park *et al.*, 2002). On note également la présence de sorbitol chez d'autres espèces, notamment chez le maïs (*Zea mays,* Doehlert, 1987) et le soja (*Glycine max*, Kuo *et al.*, 1990), où il a été identifié au sein des graines, et chez la tomate (*Solanum lycopersicum*, Cataldi *et al.*, 1998).

Bien que le rosier appartienne à la famille des Rosacées, aucune trace de sorbitol n'a été détectée au sein des bourgeons et des nœuds de *Rosa hybrida* 'Radrazz', quelle que soit la condition lumineuse testée (Figure 46). Des résultats identiques ont été obtenus lors de mesures réalisées au sein d'autres organes de rosier tels que les feuilles ou les racines (V. Guérin, communication personnelle). Cependant, il se peut que les quantités soient infimes et inférieures au seuil de détection permis par notre technique de dosage (par HPLC). Cette hypothèse est confortée par les récents travaux de Sutsawat *et al.* (2008) menés chez le fraisier (*Fragaria ananassa*), espèce appartenant aux Rosacées et génétiquement très proche du rosier, où des faibles quantités de sorbitol (de l'ordre de 0,26 $mg.g^{-1}$ de poids frais) ont pu être détectées dans le fruit. Plusieurs travaux notent d'ailleurs l'importance de sucres dont les quantités sont faibles dans la croissance des plantes, comme c'est le cas pour le tréhalose (Schluepmann *et al*., 2003). Bellaloui *et al.* (1999) ont ainsi pu noter que des faibles quantités de sorbitol étaient nécessaires au transport du bore, élément essentiel à la croissance des plantes vasculaires.

3-1-2. La lumière ne module pas l'activité de la NAD-SDH

Chez plusieurs arbres fruitiers de la familles des Rosacées (*Prunus persica* L., Lo Bianco *et al*., 1999a,b ; *Malus domestica*, Park *et al*., 2002), la NAD-SDH catalyse l'oxydation du sorbitol en fructose et l'augmentation de fructose dans les fruits est alors mesurée. Nos résultats montrent qu'une activité de ce type existe au sein des bourgeons de *Rosa hybrida* 'Radrazz' (Figure 47) et participerait au débourrement. Cependant, cette activité est similaire quelle que soit la condition lumineuse testée. L'implication de l'enzyme au cours du photocontrôle du débourrement du bourgeon axillaire chez le rosier semble donc restreinte.

Cependant, il est intéressant de noter que l'enzyme peut également fonctionner dans le sens d'une synthèse de sorbitol à partir de fructose. C'est ce qui est observé chez le maïs (*Zea mays*, Doehlert, 1987) et le fraisier (*Fragaria ananassa*, Sutsawat *et al.*, 2008). Dans ce cas, on peut s'interroger sur le rôle d'une telle activité. Récemment, il a été proposé que, dans ce cas, l'activité de la NAD-SDH permettrait principalement la régénération de NAD^+, nécessaire au maintien du statut énergétique de la cellule (*Zea mays*, Morais de Sousa *et al.*, 2008).

Chez le rosier, la mesure de l'activité enzymatique de la NAD-SDH dans le cas d'une synthèse de sorbitol n'a pas été réalisée, le protocole n'ayant pas pu être testé sur le matériel végétal utilisé. Dans notre cas, les concentrations en fructose (données non montrées) et en sorbitol (Figure 46) mesurées au sein du bourgeon sont très faibles. L'accumulation

préférentielle de l'un ou l'autre aurait pu nous permettre d'envisager le sens principal de réaction de la NAD-SDH chez le rosier. Cependant, du fait de la proximité génétique entre le fraisier et le rosier, on peut penser que l'activité principale de la NAD-SDH est identique chez ces deux plantes et qu'elle permettrait la synthèse de sorbitol à partir de fructose. Une expérience complémentaire serait nécessaire afin de le démontrer.

3-1-3. L'expression génique de la NAD-SDH est régulée par l'obscurité

L'expression génique de l'isoforme de NAD-SDH étudiée chez le rosier au cours du débourrement du bourgeon axillaire et en fonction des conditions lumineuses (Figure 48) présente un profil différent de celui observé pour l'activité de l'enzyme (Figure 47) : alors que l'activité enzymatique reste stable au cours du temps et quelle que soit la condition lumineuse testée, l'expression génique est, quant à elle, fortement surexprimée à l'obscurité.

L'hypothèse d'un contrôle post-transcriptionnel peut être envisagée pour expliquer cette différence entre les deux niveaux d'observation (ARNm et protéine). Un tel contrôle a d'ailleurs été observé chez plusieurs espèces végétales. Ainsi, chez la pomme (*Malus domestica*) et le nachi (*Pyrus pyrifolia*), le sorbitol et le glucose régulent l'activité enzymatique de la NAD-SDH (Archbold, 1999 ; Iida e*t al.*, 2004). Chez le fraisier (*Fragaria ananassa*), ce sont le saccharose et le fructose qui, en plus du sorbitol, permettent une augmentation de l'activité de l'enzyme (Sutsawat *et al.*, 2008). En se basant sur ces travaux, on peut imaginer que, chez le rosier, de tels contrôles existent aussi.

Cependant, en fonction de l'isoforme de NAD-SDH étudiée, il arrive que des profils similaires soient observés entre l'activité enzymatique et l'expression génique de la NAD-SDH (*Malus pumila*, Yamada *et al.*, 1999 ; *Pyrus communis* : Yamada *et al*., 2006 ; Suzue *et al*., 2006). Si le rosier se comporte comme le fraisier et que la NAD-SDH permet la synthèse de sorbitol, il est alors possible que l'activité de l'enzyme et l'expression génique aient des profils similaires au cours du débourrement. Seule la mesure de cette activité enzymatique nous permettrait d'identifier alors un rôle possible de la NAD-SDH au cours du débourrement.

En conclusion, il est impossible à l'heure actuelle de conclure sur une quelconque implication du métabolisme du sorbitol dans le débourrement du bourgeon axillaire chez le rosier et sur le rôle du photocontrôle de ce métabolisme, uniquement observé pour l'expression génique de la NAD-SDH. Des travaux ultérieurs sur l'activité de cette enzyme, et

notamment la mesure de celle-ci dans le sens d'une synthèse de sorbitol, apporteront de nouveaux éléments quand au rôle de ce métabolisme.

3-2. Etude du photocontrôle du métabolisme glucidique au cours du débourrement chez le rosier

3-2-1. La lumière favorise l'augmentation des quantités de sucres au sein du bourgeon

L'implication du saccharose, des sucres solubles et de l'amidon au cours du débourrement a été montrée chez plusieurs espèces (*Malus domestica*, Brunel, 2001 ; *Prunus persica* L., Maurel, 2003 ; *Quercus robur* L., Le Hir, 2005). Nos résultats montrent qu'il en va de même chez le rosier. En effet, suite à la décapitation et quelle que soit la condition lumineuse testée, les quantités de saccharose et de glucose diminuent fortement au sein des bourgeons (Figures 49 A-B) et des nœuds (Figures 49 D-E). Puis, en présence de lumière, ces quantités ré-augmentent. Il semble donc que ces deux sucres soient fortement impliqués dans le débourrement du bourgeon de rosier. De plus, à l'obscurité, alors qu'aucun débourrement n'est observé, les quantités de saccharose et de glucose restent faibles. Aucune croissance n'étant observé à l'obscurité, il est probable que ces quantités soient insuffisantes pour la permettre.

On peut également s'interroger quand à l'origine de l'augmentation des quantités de glucose et de saccharose en présence de lumière au sein des bourgeons et des nœuds. Un transport de saccharose vers l'organe en croissance est fortement probable, le bourgeon se comportant alors comme un organe puits (Tort, 1996). Il a d'ailleurs été montré chez *Rosa hybrida* 'Baccara' que le transport de sucres vers l'apex en croissance (après le débourrement) était fortement stimulé en présence de lumière (Mor & Halevy, 1980 ; Mor *et al*., 1980).

L'augmentation de glucose peut quand à elle être expliquée par une dégradation du saccharose et de l'amidon. En effet, la stimulation des enzymes impliquées dans la dégradation du saccharose, telles que les invertases acides vacuolaire et pariétale et la saccharose synthase, au sein d'organes puits en croissance a été mise en évidence chez plusieurs espèces (*Beta vulgaris*, Sokolova *et al.*, 2002 ; *Vigna radiata*, Yun *et al*., 2002 ; *Prunus persica* L. Batsch., Maurel *et al.*, 2004a ; *Quercus robur* L., Le Hir *et al*., 2005). La mobilisation des réserves amylacées lors de la reprise d'activité des bourgeons a, quant à elle, été observée chez plusieurs espèces (*Acer pseudoplatanus*, Catesson, 1964 ; *Fraxinus excelsior* L., Cottignies, 1986 ; *Populus sp*., Bonicel *et al*., 1987 ; *Betula pubescens*, Rinne *et*

al., 1994 ; *Malus domestica*, Brunel, 2001 ; *Vitis vinifera* L., Koussa *et al.,* 2001). La dégradation de l'amidon, via les amylases et l'α-glucosidase DPE2, permet alors la formation de maltose puis de glucose (Lu & Sharkey, 2006), sucre aussitôt métabolisé et permettant la croissance cellulaire. Chez le rosier, en présence de lumière, les quantités d'amidon au sein des bourgeons (Figure 49C) et des nœuds (Figure 49F) diminuent. On peut ainsi penser que ces baisses des teneurs en amidon contribuent, en plus de la dégradation du saccharose qui afflue vers le bourgeon, à la formation de glucose, dont les quantités augmentent en présence de lumière au sein des bourgeons (Figure 49B) et des nœuds (Figure 49E).

Il est également intéressant d'observer que, 48 h après décapitation, la quantité d'amidon ré-augmente à la lumière et ceci uniquement au sein des bourgeons. La néo-synthèse d'amidon nécessitant la présence d'ADP-Glucose au sein de la cellule, les quantités de glucose mesurées au sein du bourgeon (Figure 49B) doivent donc être suffisantes pour permettre à la fois la croissance et la reformation de réserves d'amidon. Ce cas de figure n'est pas observé chez les bourgeons placés à l'obscurité où, au contraire, les quantités en amidon restent faibles tout au long du traitement (Figure 49C). C'est également ce qui est observé dans les nœuds (Figure 49F). On peut donc supposer, qu'à l'obscurité, la dégradation de l'amidon contribue à la formation du glucose nécessaire au maintien d'un métabolisme cellulaire de base, néanmoins insuffisant pour permettre le débourrement.

3-2-2. L'activité enzymatique de l'IAV est sous photocontrôle, mais pas celle de l'IAP

Nos résultats montrent l'augmentation des teneurs en glucose au cours du débourrement (Figure 49B). Ceci laisse penser que les enzymes permettant la dégradation du saccharose, notamment les invertases acides vacuolaire (IAV) et pariétale (IAP) et la saccharose synthase (SUSY), sont impliquées lors de ce processus. Des travaux précédents, menés chez différentes espèces, sont en faveur de cette hypothèse. Il a notamment été montré que l'IAV avait une très forte activité au sein des organes puits (jeunes feuilles en croissance, Sokolova *et al.*, 2002 ; tige, Yun *et al.*, 2002 ; fruits, Zhang & Wang, 2002).

Les activités de l'IAV et de l'IAP ont été détectées au sein des bourgeons (Figures 50 A-B) et des nœuds (Figures 50 C-D) et des différences significatives entre les conditions de lumière et d'obscurité ont été observées pour l'IAV. En effet, au sein des bourgeons, l'activité enzymatique de l'IAV augmente fortement en présence de lumière et, au contraire, reste stable à l'obscurité (Figure 50A). C'est également ce qui a été observé chez les cotylédons de radis (*Raphanus sativus* L., Zouaghi, 1976). Ainsi, en présence de lumière, l'IAV participerait, en permettant la formation de glucose, à fournir le carbone et l'énergie

nécessaire au maintien de la turgescence cellulaire, force motrice de la croissance, et contribuerait au débourrement. De plus, des travaux menés chez le chêne pédonculé (*Quercus robur* L.) relatent que l'activité IAV dans les bourgeons suit l'activité organogénique du méristème (Parmentier, 1993 ; Le Hir, 2005). Ainsi, le bourgeon de rosier semble répondre de la même façon : l'activité IAV est faible (Figure 50A) dans un bourgeon placé à l'obscurité, pour lequel aucune organogenèse n'est observée (Figure 34), alors qu'elle est forte dans le bourgeon en pleine production de nouveaux primordia foliaires.

Au sein des nœuds, l'activité IAV augmente en présence de lumière lors des premières 24 h suivant la décapitation (Figure 50C), ce qui permet une dégradation du saccharose de la tige. Ceci peut ainsi expliquer l'augmentation concomitante de la teneur en glucose mesurée au sein du nœud en présence de lumière (Figure 49E).

Concernant l'IAP, aucune variation significative de l'activité n'a été observée entre les conditions lumière et obscurité (Figures 50 B-D). L'activité enzymatique IAP ne semblerait donc pas être régulée par la lumière. C'est également ce qui a été observé chez le tubercule de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) où les changements d'environnement lumineux (modulation de l'intensité) n'entraînent pas de modification de l'activité IAP (Chen & Setter, 2003). L'enzyme IAP ne constituerait donc pas l'élément moteur du photocontrôle du débourrement.

Nous n'avons pas pu détecter l'activité enzymatique de la SUSY, une autre enzyme participant à la dégradation du saccharose et dont le rôle dans l'établissement des force de puits a été établi (Winter & Huber, 2000). On peut toutefois s'interroger sur le photocontrôle de l'activité de cette enzyme. Différents travaux laissent penser que la lumière régulerait l'activité de la SUSY, comme chez les feuilles de nectarinier (*Prunus persica* L. var. *nectarina*, Wang *et al*., 2005) et les drupes du caféier (*Coffea arabica* L., Geromel *et al.*, 2008). Afin de conclure sur un tel photocontrôle chez le rosier, un nouveau protocole de mesure de l'activité enzymatique de la SUSY devra être mis au point chez cette plante.

3-2-3. La lumière régule l'expression des gènes codants pour l'IAV et la SUSY

Nos résultats indiquent que les deux gènes codants l'IAV et la SUSY, au sein du bourgeon, sont sous photocontrôle. Leurs profils d'expressions sont, en effet, différents en fonction des conditions d'éclairement subies par la plante. Nous discuterons successivement l'impact des intensités puis des qualités lumineuses.

3-2-3-1. Lumière/obscurité

Au sein du bourgeon, l'expression du gène codant l'IAV est fortement stimulée par la lumière (Figure 51A). Au contraire, à l'obscurité, l'expression génique est faible. Ce profil est donc semblable à ce qui est observé pour l'activité de l'enzyme avec, toutefois, un léger décalage dans le temps. En effet, l'activité enzymatique de l'IAV augmente majoritairement après 48 h de lumière (Figure 50A) alors que l'expression génique est très fortement stimulée dès 24 h de lumière (Figure 51A). Les travaux de Gonzalez *et al.* (2005) réalisés sur des pétioles de betterave (*Beta vulgaris*) ont mis en évidence une régulation similaire de l'expression du gène *BVInv-V3*, codant une invertase acide vacuolaire. L'expression de ce gène augmente en présence de lumière et diminue à l'obscurité. Dans cette étude, les auteurs observent également un profil similaire mais décalé dans le temps pour l'activité de l'enzyme.

L'expression génique de la SUSY est également modifiée par les conditions lumineuses testées. Alors qu'une légère stimulation de l'expression est observée après 72 h de lumière, on observe au contraire une diminution de l'expression à l'obscurité, et ceci dès 24 h après la décapitation (Figure 52A). Seules quelques études montrent une régulation de l'expression génique de cette enzyme en présence de lumière. Ainsi, chez les feuilles de blé (*Triticum aestivum* L.), la lumière module l'expression des gènes codants les deux isoformes de SUSY : l'une est stimulée et l'autre est diminuée (Marana *et al.*, 1990). La même chose est observée au cours de la germination chez le riz (*Oryza sativa*), où les expressions des gènes codants trois isoformes de SUSY différentes sont modulées différemment en présence de lumière (Huang *et al.*, 1996). On peut s'interroger sur la régulation de l'expression du gène codant la SUSY chez le rosier. Alors que celle-ci semble maintenue en présence de lumière, elle est fortement diminuée à l'obscurité (Figure 52A). S'agit-il alors, à l'obscurité, (1) d'une répression ou (2) d'une absence de stimulation ? A notre connaissance, aucune donnée bibliographique ne traite de cette question et celle-ci reste ouverte. Il serait alors intéressant d'identifier les facteurs de transcription responsables d'une telle régulation.

Ainsi, chez le rosier, on observe une diminution de l'expression génique des gènes codants l'IAV et la SUSY à l'obscurité (Figures 51A et 52A). Ces profils sont en accord avec nos précédentes observations : l'activité enzymatique de l'IAV est également réduite à l'obscurité (Figure 50A) et les quantités de saccharose et de glucose également (Figures 49 A-B). L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que l'obscurité régule fortement le métabolisme glucidique : celui-ci ne serait pas suffisamment stimulé à l'obscurité pour permettre la croissance et donc le débourrement.

3-2-3-2. Effet de l'intensité lumineuse

Nos résultats précédents indiquent que les gènes codants l'IAV et la SUSY s'expriment en présence de lumière (Figures 51A et 52A). De façon surprenante, les expressions de ces deux gènes sont plus fortement stimulées par les intensités lumineuses faibles et moyennes que par les fortes intensités lumineuses (Figures 51B et 52B). Un résultat similaire a été observé au sein des drupes de café (*Coffea arabica* L.). Au sein de cet organe, l'expression génique de la *SUSY* est plus élevée sous des intensités lumineuses moyennes que sous des intensités lumineuses fortes (Geromel *et al*., 2008). Une hypothèse a alors été envisagée lorsque l'intensité lumineuse est plus faible : la formation de plus fortes quantités de sucres réducteurs, caractéristiques des divisions cellulaires intensives au sein des tissus jeunes (Weber *et al.*, 1998), permet une meilleure maturation des fruits et leurs confèrent une meilleure qualité (Vaast *et al*., 2006). On peut s'interroger sur le rôle d'une telle régulation chez le bourgeon de rosier. Nos résultats indiquent que, pour des intensités lumineuses moyennes, l'organogenèse et la croissance des primordia foliaires ont lieu mais de façon moins prononcée que pour des intensités lumineuses plus fortes (Figures 40 et 41). On peut ainsi penser que, sous des intensités lumineuses moyennes, les quantités de sucres sont limitantes et entrainent une organogenèse et une croissance des primordia foliaires moins importantes.

3-2-3-3. Qualité lumineuse

Alors que les gènes de l'*IAV* et de la *SUSY* voient leurs expressions modulées par l'intensité lumineuse (Figures 51B et 52B), ni l'un ni l'autre ne semble sous le contrôle spécifique d'une qualité lumineuse particulière. En effet, que ce soit pour l'*IAV* ou pour la *SUSY*, les expressions géniques sont stimulées par les lumières rouge clair et bleue (Figures 51C et 52C). Il est toutefois intéressant de noter que, pour le gène de l'*IAV*, l'expression est plus fortement stimulée sous lumière blanche que sous une seule qualité lumineuse (Figure 51C). Ainsi, en présence de lumière blanche, l'action combinée de bandes spectrales rouge clair et bleue permettrait une meilleure stimulation de l'expression du gène. Cependant, ces seuls résultats ne permettent pas de conclure quand aux éléments en amont de la voie de signalisation aboutissant à la régulation des gènes de l'*IAV* et de la *SUSY*, comme il a pu être fait chez l'orge (*Hordeum vulgare*). Chez cette espèce, une augmentation de l'expression du gène *HvNCED1* a été mise en évidence uniquement en présence de lumière bleue (Gubler *et al.*, 2008). Ce gène code la 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, une enzyme impliquée dans la régulation de la biosynthèse de l'acide abscissique chez les graines (Lefebvre *et al.*, 2006) et

jouant un rôle dans l'induction de la dormance (Feurtado & Kermode, 2007). Les travaux de Gubler *et al.* (2008) ont ainsi conclu que, chez l'orge (*Hordeum vulgare*), les phytochromes ne participaient pas à la régulation de la dormance. Au vu de nos résultats, impliquer l'un ou l'autre type de photorécepteurs dans la régulation des gènes codant l'IAV et la SUSY au sein du bourgeon de rosier n'est, pour le moment, pas possible.

L'ensemble de nos résultats (schématisés sur la Figure 53) montrent que le métabolisme glucidique est fortement régulé par la lumière au cours du débourrement chez le rosier. Ce photocontrôle s'exerce au niveau génique, et potentiellement au niveau protéique. En effet, des activités d'enzymes intervenant dans la dégradation du saccharose et leurs expressions géniques sont modifiées en fonction des conditions d'éclairement. La lumière favorise la dégradation du saccharose en stimulant l'activité enzymatique de l'IAV et son expression génique, ainsi que l'expression du gène codant la SUSY (Figure 53). Au contraire, à l'obscurité, ces dernières sont restreintes. La croissance étant fortement dépendante de la disponibilité en sucres, celle-ci est favorisée en présence de lumière (ce qui a été observé précédemment dans le Chapitre I) et inhibée à l'obscurité. Ainsi, le photocontrôle du débourrement mis en évidence chez le rosier semble fortement dépendant du métabolisme glucidique, lui-même sous contrôle lumineux.

Chapitre III

Etude du photocontrôle de la croissance des jeunes feuilles préformées et de l'élongation cellulaire

Chapitre III. Etude du photocontrôle de la croissance des jeunes feuilles préformées et de l'élongation cellulaire

Les résultats présentés dans les Chapitres I et II ont mis en évidence le besoin absolu de lumière pour le débourrement chez six variétés de rosiers de jardin et le photocontrôle du métabolisme glucidique au cours de cette phase de développement. Il a été montré que l'organogenèse et la croissance des feuilles préformées étaient sous photocontrôle. Afin de mieux caractériser le contrôle par la lumière de la croissance des primordia foliaires, des observations macroscopiques et microscopiques au niveau cellulaire ont été réalisées chez *Rosa hybrida* 'Radrazz'. La croissance des primordia étant la résultante de divisions et d'élongations cellulaires, un gène intervenant dans le processus d'élongation cellulaire a fait l'objet d'une étude particulière[2]. Une expansine a été clonée chez le rosier et son expression génique sous différentes conditions lumineuses a été étudiée. Son expression au sein de différents territoires du bourgeon ainsi que l'étude de son promoteur ont également été réalisées.

1. Etude morphologique de l'impact de la lumière sur la croissance des jeunes feuilles préformées

1-1. Mesures de la croissance des jeunes feuilles

La croissance des jeunes feuilles préformées au sein du bourgeon distal a été étudiée chez *Rosa hybrida* 'Radrazz'. Les longueurs des trois premières feuilles assimilatrices préformées (F1, F2, F3) contenues dans le bourgeon axillaire distal des plantes expérimentales placées sous lumière blanche (200 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, 16h/24h) ou à l'obscurité ont été mesurées journalièrement depuis la décapitation (T0) afin de suivre leur croissance.

Les résultats montrent un fort impact de l'éclairement sur la croissance des jeunes feuilles (Figure 54). A la lumière, la taille de la feuille F1 augmente très fortement après 24 h de traitement pour atteindre une longueur six fois plus importante au bout de 96 h. A l'obscurité, l'élongation de la feuille F1 est au contraire réduite et n'a augmenté que d'1,7 fois au bout de 96 h. Cette croissance à l'obscurité a lieu principalement dans les premières 24 h. Le même

[2] Le travail concernant l'expansine a en partie été réalisé en collaboration avec Sonia Akinghafane (Master 2 Recherche, 2007) et Damien Bouchard (L3, 2008).

contraste de croissance est observé chez les feuilles assimilatrices F2 et F3, sous lumière et obscurité. Les élongations sont toutefois moins fortes que celles observées chez F1 (Figure 54).

1-2. Elongation des cellules des jeunes feuilles

Afin d'étudier l'impact des conditions d'éclairement sur l'élongation cellulaire au cours de la croissance des jeunes feuilles préformées, des plantes expérimentales ont été cultivées pendant 7 jours à la lumière blanche ou à l'obscurité. Les quatre écailles du bourgeon distal ont été enlevées et les cellules de la première feuille préformée (F1) ont été observées au microscope électronique à balayage (Figure 55). Les cellules n'ayant pas la même longueur selon les zones le long du limbe, deux zones ont été définies : (1) une zone située à la base du limbe et (2) une située à son extrémité distale. Pour chaque zone, la longueur moyenne des 25 cellules les plus longues a été déterminée (Tableau IX). Les résultats montrent qu'à la lumière, les cellules de la zone 2 sont effectivement plus longues que celles de la zone 1. Si l'on compare la longueur des cellules de bourgeons placés à la lumière ou à l'obscurité, on constate que les cellules des jeunes feuilles des bourgeons placés à la lumière sont significativement plus longues que celles des jeunes feuilles des bourgeons placés à l'obscurité. Ceci est observé dans les deux zones définies. Ces résultats suggèrent un fort photocontrôle de l'élongation cellulaire, avec un impact positif de la lumière.

2. Etude de l'expression d'un gène impliqué dans l'élongation cellulaire : une expansine.

La présence des expansines, protéines intervenant dans le processus d'élongation cellulaire (Sharova, 2008), à été montré au sein du méristème et de jeune feuilles (*Solanum lycopersicum*, Fleming *et al.*, 1997 ; *Nicotiana tabacum*, Pien *et al.*, 2001). Ceci laisserait penser que leur rôle serait non négligeable au cours du débourrement. Aussi, il nous a paru pertinent de nous intéresser à ces protéines.

2-1. Clonage d'un gène d'expansine chez le rosier (*RhEXP*)

Les données bibliographiques indiquent que les expansines interviennent dans l'élongation cellulaire (Sharova, 2008) et c'est notamment le cas de l'expansine 10 qui, chez *Arabidopsis thaliana*, est impliquée dans la régulation de la morphogenèse foliaire et est présente au sein de l'apex (Cho & Cosgrove, 2000). Aussi, c'est cette isoforme que nous avons voulu identifier chez le rosier.

Les séquences nucléotidiques de gènes codant l'expansine 10 de *Solanum lycopersicum* L. (AF184233), *Cucumis sativus* L. (AY940479) et *Arabidopsis thaliana* (AF229437) ont permis de produire des amorces dégénérées. Celles-ci ont permis l'amplification d'un fragment de 290 pb chez le rosier à partir d'ARN de bourgeons exposés à la lumière et en cours de débourrement (Figure 56). La recherche d'homologie de séquence dans la banque GenBank par le logiciel BLAST (Zhang *et al.*, 2000) montre de fortes similarités avec les séquences nucléotidiques suivantes (Figure 56):

- 96 % avec l'expansine 4 de *Prunus persica* L. (*PpEXP4*, AB054319),
- 93 % avec l'expansine 3 de *Malus domestica* (*MdEXP3*, AF527800),
- 81 % avec l'expansine 10 d'*Arabidopsis thaliana* (*AtEXP10*, AF229437),
- 76 % avec l'expansine 1 d'*Arabidopsis thaliana* (*AtEXP1*, NM_179537).

Le fragment amplifié correspond bien à une expansine : celle-ci a été nommée *RhEXP*. Un arbre phylogénétique a également été construit à partir de l'alignement multiple de différentes séquences nucléotidiques codant des expansines et montre bien la forte proximité avec l'expansine 3 de *Malus domestica* (Figure 57). L'alignement de la séquence protéique traduite à partir du gène *RhEXP* avec d'autres expansines végétales a été réalisé (Figure 58). Les nombreuses séquences conservées entre les expansines appartenant à différentes espèces plus ou moins éloignées génétiquement du rosier confirment que le gène code bien une expansine.

2-2. Expression du gène *RhEXP* au sein de la plante

Le profil d'expression de *RhEXP* a été étudié au sein de différents organes de rosier, ainsi qu'au sein de territoires du bourgeon pour en évaluer sa spécificité d'expression.

2-2-1. Expression dans différents organes

L'expression du gène *RhEXP* au sein de différents organes de la plante expérimentale a été étudiée par RT-PCR (Figure 59). Une bande de taille attendue (205 pb) est observée pour

tous les échantillons d'ADNc testés : le gène *RhEXP* s'exprime dans les racines, les nœuds et les bourgeons, les feuilles (jeunes ou matures), les pétales et les étamines.

2-2-2. Expression dans les différents territoires du bourgeon

Le clonage du gène *RhEXP* à partir d'ADNc de bourgeon distal indique que ce gène est exprimé au sein de cette entité. Des réactions de RT-PCR ont été réalisées sur des ADNc de méristèmes *sensu stricto* et sur des ADNc de jeunes feuilles prélevées sur ces mêmes bourgeons (Figure 60). Ce travail a nécessité la mise au point préalable d'un protocole de RT-PCR sur quelques cellules.

La présence d'une bande à la taille attendue (205 pb) montre que le gène est exprimé au sein de ces deux territoires du bourgeon. Ainsi donc, ce gène pourrait participer à la fois à l'activité organogénique du méristème apical caulinaire et à la morphogenèse foliaire.

2-3. Expression du gène *RhEXP* dans les bourgeons distaux soumis à différents traitement lumineux

L'expression génique du gène codant une expansine de rosier, *RhEXP*, a été étudiée par RT-PCR quantitative en temps réel. Une première étude a été réalisée, sur des ADNc de bourgeons distaux de *Rosa hybrida* 'Radrazz', au cours du temps (de 0 à 96 h après décapitation) sous lumière blanche et à l'obscurité. Une seconde étude a été conduite sur des bourgeons distaux de plantes expérimentales placées pendant 72 h sous différentes intensités et qualités lumineuses.

2-3-1. Lumière blanche vs obscurité

Le profil d'expression du gène *RhEXP* montre des différences significatives entre les conditions lumière (200 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, 16h/24h) et obscurité (Figure 61), et indique que ce gène est sous photocontrôle au cours du débourrement. En effet, en présence de lumière blanche, l'expression du gène est stimulée de manière constante. Au contraire, l'expression du gène diminue à l'obscurité et ceci dès le début du traitement. Cette diminution s'accentue au cours du temps.

2-3-2. Effet de la quantité lumineuse et de la qualité lumineuse sur l'expression de *RhEXP*

Les résultats précédents ont montré que la lumière avait un fort impact sur l'expression génique de *RhEXP*. Afin d'approfondir un peu plus la connaissance de cette régulation, l'expression génique de *RhEXP* a été mesurée, dans un premier temps, sous différentes valeurs de flux de photons de lumière blanche, 72 h après décapitation. Dans un second temps, l'impact sur l'expression génique de qualités lumineuses différentes a été mesuré.

2-3-2-1. Effet du flux de photons

L'expression de *RhEXP* a été étudiée sur des ADNc de bourgeons axillaires distaux de plantes expérimentales placées pendant 72 h sous différentes intensités de lumière blanche : 0, 2, 20 ou 200 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ (16h/24h). A l'obscurité, une expression génique très faible est à nouveau observée (Figure 62A). L'expression génique est stimulée à la lumière, quelle que soit l'intensité lumineuse émise. Il est intéressant d'observer que les intensités faibles (2 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) et moyennes (20 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) stimulent davantage l'expression du gène que la plus forte intensité lumineuse utilisée (200 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$). L'expression relative du gène sous une lumière blanche de 20 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ est en effet 1,5 fois plus élevée que sous une lumière blanche à 200 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$.

2-3-2-2. Effet de la qualité lumineuse

Les lumières bleue et rouge clair seules permettent la stimulation de l'expression de *RhEXP* dans les bourgeons (Figure 62B). A intensité égale (20 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, 16h/24h), la lumière bleue est plus efficace que la lumière rouge clair pour stimuler l'expression de *RhEXP*. La lumière bleue est aussi efficace que la lumière blanche, composée en partie par les deux qualités lumineuses bleu et rouge clair.

2-4. Etude de la région promotrice du gène *RhEXP*

Nos résultats montrant que l'expression génique de *RhEXP* varie en fonction des conditions d'éclairement, nous nous sommes intéressés aux éléments de réponse présents dans la région promotrice du gène, et notamment aux éléments de réponse à la lumière.

La réaction de Genome Walking nous a permis d'obtenir une partie de la région promotrice du gène *RhEXP* (1,915 kb) : celle-ci est représentée Figure 63. L'étude du promoteur a débuté par une analyse informatique à l'aide du programme PLACE

(http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/index.html). Cette analyse a mis en évidence de nombreux éléments cis-régulateurs potentiels, parmi lesquels de nombreux éléments de réponse à la lumière. Ceux-ci sont représentés graphiquement sur la Figure 64 et leurs rôles sont répertoriés dans le Tableau X.

Une séquence identifiée comme un motif TATA a été trouvée 74 pb avant l'ATG (motif TTATTT, souligné sur la Figure 63. Vingt-quatre motifs GATA appartenant à la famille des 'Light-Responsive Element' (LRE) ont été identifiés sur la séquence promotrice de *RhEXP*. Quatorze se trouvent sur le brin négatif et dix sur le brin positif.

D'autres LRE ont également été identifiés : dix-neuf motifs GT-1 consensus et huit motifs IBOXCORE, dont les séquences respectives sont GRWAAW et GATAA. Ces motifs sont à la fois présents sur les brins négatif et positif.

Enfin, deux motifs supplémentaires, chacun étant identifié une seule fois sur le brin négatif, ont été mis en évidence : le motif REALPHALGLHCB21, dont la séquence est AACCAA, et le motif SORLIPZAT, dont la séquence est GGGCC.

3. Discussion

3-1. L'obscurité inhibe la croissance des jeunes feuilles préformées en limitant l'élongation cellulaire

Nous avons montré précédemment que le débourrement des bourgeons n'avait pas lieu à l'obscurité, chez six variétés de rosiers de jardin, et qu'il n'y avait pas de production de nouveaux organes au sein du méristème (Chapitre I). Afin d'observer ce qu'il en était de la croissance des jeunes feuilles préformées, la croissance des trois premières feuilles assimilatrices du bourgeon (F1, F2 et F3) a été mesurée au cours du temps, en présence de lumière blanche (200 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, 16h/24h) ou à l'obscurité (Figure 54). Les résultats montrent que, pendant les vingt-quatre premières heures suivant la décapitation, la croissance des jeunes feuilles est observée aussi bien en présence de lumière qu'à l'obscurité. Puis, alors que la croissance s'accentue en présence de lumière, elle est fortement inhibée à l'obscurité. Une telle réduction de l'expansion du limbe foliaire est décrite pour les feuilles épanouies d'*Arabidopsis thaliana* placées à l'obscurité. En effet, ces dernières présentent un syndrome d'évitement de l'ombre pour lequel il est décrit une réduction de l'expansion du limbe foliaire

(Reed *et al*., 1993 ; Kozuka *et al.*, 2005 ; Tsukaya, 2005). Cette croissance réduite pourrait être en partie expliquée par une réduction de l'élongation cellulaire. Aussi, ce processus a été observé au sein de la première feuille assimilatrice (F1), après 7 jours de lumière ou d'obscurité (Figure 55). Que ce soit dans la partie basale ou dans la partie apicale de la jeune feuille, la taille moyenne des cellules est plus importante en présence de lumière qu'à l'obscurité (Tableau IX). Ainsi, à l'obscurité, l'inhibition de l'élongation cellulaire, considérée par certains auteurs comme la force motrice nécessaire à la croissance (Foard, 1971 ; Grandjean *et al.*, 2004), pourrait être l'origine de l'absence de débourrement du bourgeon.

A notre connaissance, un tel photocontrôle de l'élongation cellulaire n'a jamais été mis en évidence au sein d'une feuille encore non épanouie. Ceci soulève une nouvelle fois le questionnement sur la transduction du signal lumineux perçu à la surface du bourgeon vers les jeunes feuilles enfouies sous les écailles.

3-2. Etude de l'expression génique d'une expansine de rosier et de son photocontrôle au cours du débourrement

Comme nous venons de le montrer, la croissance des primordia foliaires lors du débourrement des bourgeons chez le rosier semble être conditionnée par les élongations cellulaires (Figures 54 et 55, Tableau IX). On peut s'interroger sur le contrôle moléculaire de ce processus. A notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée chez les bourgeons, la plupart des études portant en effet sur le photocontrôle de l'élongation cellulaire au sein de l'hypocotyle et des cotylédons lors de la germination (*Avena sativa* L., Cosgrove & Li, 1993 ; *Solanum lycopersicum*, Caderas *et al.*, 2000 ; *Datura ferox* L., Mella *et al.*, 2004). Afin d'étudier plus en détail ce processus, nous nous sommes intéressés à des protéines impliquées dans le relâchement de la paroi cellulaire : les expansines (Cosgrove, 2005). L'implication de l'expansine 10 dans la morphogenèse foliaire ayant été mis en évidence (*Arabidopsis thaliana*, Cho & Cosgrove, 2000), c'est cette isoforme qui a été choisie pour être clonée chez *Rosa hybrida* 'Radrazz', puis pour être étudiée au cours du débourrement.

3-2-1. Clonage d'une expansine chez *Rosa hybrida* 'Radrazz'

Un fragment de 290 pb a pu être cloné. Son alignement avec d'autres séquences nucléotidiques (Figure 56) indique qu'il existe de très fortes homologies avec d'autres expansines d'*Arabidopsis thaliana*, dont l'expansine 10 utilisée pour définir les amorces

dégénérées, et d'autres expansines de Rosacées (genres *Prunus* et *Malus*). Cette proximité génétique a également mise en évidence sur l'arbre phylogénétique réalisé à partir de plusieurs séquences nucléotidiques codant des expansines (Figure 57). Cependant, bien que nous nous soyons basés sur l'expansine 10 pour cloner le gène *RhEXP*, celui-ci est plus proche d'autres isoformes (3 et 4). Ainsi, il semblerait que plusieurs expansines seraient impliquées dans l'activité organogénique du méristème.

La séquence protéique correspondante a été alignée avec d'autres expansines (Figure 58) et certaines caractéristiques des α-expansines ont pu être, en partie, mises en évidence (Sampedro & Cosgrove, 2005). On note ainsi la présence de six résidus cystéines sur les huit attendus (positions 56, 84, 87, 92, 101 et 116, Figure 58). Le motif conservé His-Phe-Asp (ou signature HFD), ainsi que les quatre résidus tryptophane conservés, ne sont pas retrouvés du fait de la trop faible longueur de la séquence.

L'ensemble de ces éléments suggèrent fortement que le fragment cloné code bien une expansine. C'est donc à partir de cette séquence d'α-expansine de rosier, nommée *RhEXP*, que des amorces spécifiques ont été définies afin d'étudier le profil d'expression du gène au sein de différents organes et au cours du débourrement.

3-2-2. Etude de l'expression génique de *RhEXP* au sein de différents organes

La mise en évidence de l'expression génique de *RhEXP* au sein de différents organes de *Rosa hybrida* 'Radrazz' indique que cette expansine n'est pas spécifique d'un organe particulier. En effet, *RhEXP* a été détecté au sein des racines, des étamines, des pétales, des feuilles, des nœuds et des bourgeons (Figure 59). Au sein même du bourgeon, *RhEXP* est exprimé à la fois au niveau des primordia foliaires et au niveau du méristème (Figure 60), ce qui suggérerait que cette expansine pourrait participer à la fois à l'activité organogénique du méristème et à la morphogenèse des primordia foliaires. Ce résultat conforte les observations de Pien *et al.* (2001) concernant la protéine CsEXPA1 qui, induite par application de tétracycline sur des apex ou des feuilles de tabac (*Nicotiana tabacum*) transformé, favorise l'initiation d'un primordium foliaire ou modifie la morphogenèse foliaire. Il semblerait donc que les différentes isoformes d'expansines existantes aient un rôle similaire, à savoir favoriser le relâchement des parois cellulaires pour permettre l'élongation cellulaire. Cependant, il est intéressant de noter que certaines isoformes d'expansines ne sont exprimées qu'à un stage de développement de donné : ainsi, le gène *RbEXPA1*, détecté dans tous les organes floraux, n'est fortement exprimé qu'au moment de la période précédant l'abscission des pétales (*Rosa bourboniana*, Sane *et al*., 2007).

3-2-3. Etude du photocontrôle de l'expression génique de *RhEXP* au cours du débourrement

Plusieurs travaux ont mis en évidence une stimulation de l'expression génique d'expansines par la lumière (*Solanum lycopersicum*, Caderas *et al.*, 2000 ; *Arabidopsis thaliana* : Ma *et al.*, 2005 ; Lopez-Juez *et al.*, 2008). Cependant, ce photocontrôle est dépendant de l'organe étudié et il est donc impossible de généraliser ces résultats à l'ensemble des organes de la plante. Au sein du bourgeon de rosier, l'analyse par RT-PCR quantitative en temps réel a permis la mise en évidence du photocontrôle de l'expression génique de *RhEXP* au cours du débourrement (Figure 61). En effet, dès 24 h après décapitation, alors que l'expression génique est constante en présence de lumière, une forte diminution de celle-ci est observée à l'obscurité. Ceci est en adéquation avec la croissance réduite des jeunes feuilles préformées et les élongations cellulaires limitées à l'obscurité (Figures 54 et 55, Tableau IX), mais également avec l'absence d'activité organogénique au sein du méristème observée à l'obscurité (Figure 38). Cependant, à l'obscurité, nous avons pu noter une faible croissance des jeunes feuilles préformées dans les 24 premières heures suivant la décapitation (Figure 54), ce qui suggère une élongation cellulaire favorisée. Plusieurs études indiquent que, de manière générale, l'activité des expansines est corrélée à leur expression génique. La synthèse ou l'activité de ces protéines dépendent donc de contrôles transcriptionnels tels que ceux exercés par les phytohormones (Cho & Cosgrove, 2004) ou les facteurs environnementaux comme la lumière (Caderas *et al.*, 2000 ; Lee & Kende, 2001). Dans notre cas, l'expression génique de *RhEXP* après 24 h d'obscurité est très fortement diminuée (Figure 61). Il est donc probable que la croissance ayant lieu pendant ce laps de temps soit permise *via* le pool de protéines présentes au sein de la jeune feuille préformée. Par la suite, la croissance et l'élongation cellulaire seraient limitées par le turn-over des protéines.

L'impact de l'intensité lumineuse et de la qualité lumineuse a également été observé sur l'expression génique de *RhEXP* (Figure 62). Il est surprenant d'observer que l'expression génique est plus fortement stimulée pour des intensités lumineuses faibles et moyennes que pour des fortes intensités lumineuses (Figure 62A). Nous avions précédemment observé une telle régulation pour l'expression génique de l'*IAV* et de la *SUSY* (Figures 51 et 52). Dans le cas de l'expansine, aucune donnée bibliographique ne rapporte, à notre connaissance, une telle régulation. Bien que la différence de stimulation soit faible (facteur 0,5), on peut s'interroger sur son rôle. On peut supposer que, sous des conditions lumineuses où l'intensité est plus faible, une quantité plus importante de protéines est nécessaire pour favoriser

l'élongation cellulaire et la croissance. On peut également penser que cette augmentation de l'expression génique aurait lieu pour répondre à un turn-over plus rapide sous des faibles intensités lumineuses. Concernant l'impact de la qualité lumineuse, la lumière bleue stimule l'expression génique au même niveau que la lumière blanche (Figure 62B). Au contraire, la lumière rouge clair entraîne une diminution de l'expression génique de *RhEXP*. L'étude de l'expression de plusieurs gènes codants des expansines chez *Stellaria longipes* a révélé que les qualités lumineuses régulaient différemment les expressions géniques des expansines considérées (Sasidharan *et al.*, 2008). Les auteurs suggèrent alors que les nombreuses isoformes d'expansines existent chez les plantes et permettent de se compléter pour favoriser l'élongation cellulaire. Ainsi, on peut supposer, dans notre cas, que le gène *RhEXP* n'est pas celui qui permet la stimulation principale de la croissance observée sous lumière Rc (Figure 42B) et qu'un autre gène codant une autre expansine intervient sous lumière Rc.

3-3. Le promoteur du gène *RhEXP* présente de nombreuses boîtes de réponse à la lumière

Le photocontrôle du gène *RhEXP* a été mis en évidence au cours du débourrement (Figure 61). Alors que la stimulation de l'expression est constante à la lumière, elle est fortement diminuée à l'obscurité. On peut d'interroger sur la signification de cette diminution : s'agit-il d'une absence de stimulation ou d'une répression ? Afin de tenter de répondre à cette question, nous nous sommes intéressés au promoteur du gène *RhEXP* et aux différentes boîtes de régulation qu'il possède. La réaction de Genome Walking nous a permis d'obtenir une séquence promotrice de 1,915 kb (Figure 63). L'analyse grâce au logiciel PLACE a fourni de nombreuses boîtes de régulation et nous nous sommes principalement intéressés aux éléments de réponse à la lumière (Figure 64, Tableau X). En effet, les promoteurs régulés par la lumière ont été fortement étudiés et des comparaisons de séquences promotrices ont permis l'identification de nombreux éléments régulateurs importants dans la réponse à la lumière (Terzaghi & Cashmore, 1995). Nos résultats indiquent la présence de six boîtes de régulation différentes, dont trois sont retrouvées fréquemment tout au long de la séquence promotrice : la GATAbox, la GT-1 consensus et la IBOXCORE.

La présence de la GATAbox a été montrée au sein des promoteurs des gènes surexprimés en présence de lumière, notamment chez les gènes *rbcs* et *cab* (Lam & Chua, 1989 ; Gilmartin *et al.*, 1990 ; Arguello-Astorga & Herrera-Estrella, 1998). Récemment, il a été montré que les facteurs de transcription GATA, des protéines de type doigt de zinc se fixant aux GATAbox,

étaient eux-mêmes induits par la lumière (Naito *et al*., 2007) mais dont le rôle *in vivo* n'a pas été clairement établi (Reyes *et al.*, 2004). Cependant, il semblerait que certains de ces facteurs jouent un rôle dans la régulation de l'élongation cellulaire. En effet, l'élongation cellulaire est plus importante chez les mutants d'*Arabidopsis thaliana* sur-exprimant la protéine GATA25 (Shikata *et al.*, 2004). Toutes ces données suggèrent que la stimulation de l'élongation cellulaire observée chez le rosier au cours du débourrement serait en partie provoquée par le photocontrôle de l'expansine, dont le promoteur, chez le rosier, contient plusieurs GATAbox (Figure 64, Tableau X).

Les IBOXCORE sont des séquences présentes dans les promoteurs de gènes régulés par la lumière et que l'on retrouve à la fois chez les monocotylédones et les dicotylédones (Terzaghi & Cashmore, 1995). Leur rôle exact n'a pas été clairement identifié. Cependant, ces séquences étant fortement présentes au sein des promoteurs de gènes régulés par la lumière, les auteurs suggèrent un rôle relativement large de régulation de plusieurs processus physiologiques et biochimiques intervenant dans la croissance et le développement.

Le motif GT-1 consensus, retrouvé dix-neuf fois dans le promoteur de *RhEXP*, est également présent dans les promoteurs de gènes régulés par la lumière (Terzaghi & Cashmore, 1995 ; Villain *et al.*, 1996) et constitue le site de liaison du facteur GT-1 participant à la stabilisation du complexe d'initiation de la transcription (Le Gourrierec *et al.*, 1999).

Il n'existe que peu de données dans la bibliographie concernant les trois autres domaines de régulations identifiés : CIACADIAN LEHLC, REALPHALGLHCB21 (ou REα) et SORLIPZAT. Ces trois éléments de régulation semblent intervenir dans la réponse à la voie de signalisation de la lumière par le phytochrome et permettraient une stimulation de l'expression du gène cible (Degenhardt & Tobin, 1996 ; Piechulla *et al*., 1998 ; Hudson & Quail, 2003). Ces éléments cis-régulateurs pourraient participer lors de la stimulation de l'expression génique de *RhEXP* sous lumière rouge clair (Figure 62B).

Il est intéressant de remarquer que, bien que des boîtes de réponse spécifiques des cryptochromes existent (Kleine *et al*., 2007), aucune n'est retrouvée dans le promoteur de *RhEXP*. On peut ainsi se demander de quelle façon la lumière bleue peut stimuler l'expression génique de *RhEXP* (Figure 61B). On peut alors penser que les phytochromes sont suffisamment actifs sous lumière bleue pour stimuler l'expression du gène.

L'ensemble de ces éléments de régulation impliqués dans la réponse à la lumière et présents au sein du promoteur du gène *RhEXP* expliquent que les expansines soient fortement régulées par la lumière. La lumière stimulerait l'expression du gène et, au contraire, une

absence de stimulation aurait lieu à l'obscurité, expliquant ainsi la diminution d'expression génique observée (Figure 61).

Pour conclure, l'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre indique que la lumière exerce un fort impact sur la croissance des primordia foliaires en favorisant l'élongation cellulaire via la stimulation de l'expression génique de *RhEXP*, gène codant une expansine et s'exprimant à la fois au sein du méristème et des primordia foliaires, protéine intervenant directement dans le relâchement des parois cellulaires. Au contraire, à l'obscurité, l'expression génique est diminuée et la croissance des primordia foliaires est réduite, empêchant ainsi le débourrement. On peut s'interroger sur la voie de signalisation de la lumière conduisant à la modulation de l'expression génique de *RhEXP*. Les éléments de régulation identifiés dans le promoteur de ce gène laissent penser que la cascade de signalisation dépendante des phytochromes intervient. Cependant, des études supplémentaires seraient nécessaires pour le confirmer.

Discussion générale

Les recherches sur la photomorphogenèse tentent de comprendre les mécanismes qui permettent aux plantes, organismes immobiles, de s'adapter et de répondre aux changements de leur environnement lumineux, par le déclenchement de processus développementaux adaptés. Les réponses photomorphogéniques essentiellement étudiées par les laboratoires sont le dé-étiolement de l'hypocotyle (Tepperman *et al.*, 2004) et l'induction florale (Cerdan & Chory, 2003). Le bon déroulement de ces processus est en effet crucial pour l'accomplissement, respectivement, de la germination et de la floraison, phases de développement qui conditionnent fortement le rendement des plantes cultivées. Pour ces deux processus, de nombreux maillons de la chaîne de transduction du signal lumineux ont été identifiés (Jiao *et al*., 2007) ainsi que des interactions avec d'autres voies de signalisation (Penfield *et al.*, 2005 ; Oh *et al*., 2006, 2007 ; Nagashima *et al*., 2008).

Le photocontrôle du débourrement des bourgeons, bien qu'il participe à toute la construction de l'appareil aérien a, au contraire et de manière étonnante, été très peu étudié. L'essentiel des travaux dans ce domaine rapporte la réponse macroscopique ou « plante-entière » aux changements de l'environnement lumineux : pourcentage de débourrement, élongation des rameaux produits, accumulation de matière fraîche, etc (Bredmose, 1997, 1998 ; Kim & Lee, 2002 ; Niinemets & Lukjanova, 2003 ; Molmann *et al*., 2006 ; Muleo & Morini, 2006, 2008). Ces résultats donnent des indications importantes quant à la conduite de plantes cultivées, notamment concernant la densité optimale de culture : celle-ci, en modulant la qualité et l'intensité de la lumière au sein de la culture, a en effet un impact majeur sur la capacité de tallage des céréales (Barnes & Bugbee, 1992 ; Evers *et al.*, 2006), ou la production de troncs peu ramifiés chez les espèces forestières (Devlin *et al*., 2007). Au regard de ces travaux macroscopiques, il n'existe toutefois que peu de recherches sur la compréhension des mécanismes sous-jacents. De ce fait, toute perspective d'application des connaissances moléculaires: sélection assistée par marqueur, production de mutants... dans l'amélioration de l'architecture des plantes au travers de la manipulation du photocontrôle du débourrement est, pour le moment, compromise.

Dans ce contexte, les objectifs de notre travail étaient doubles : d'une part, apporter des connaissances sur les processus régissant la photorégulation du débourrement ; d'autre part, évaluer le potentiel de la manipulation de ce facteur environnemental dans la modulation de la construction architecturale de la plante entière. Ces travaux appliqués aux plantes

ornementales telles le rosier pourront ainsi contribuer à l'élaboration d'itinéraires culturaux nouveaux visant à modifier la forme de ces plantes, voire leur qualité esthétique.

Les travaux pionniers de Khayat & Zieslin (1982) montrant le besoin absolu de lumière des bourgeons basaux d'un rosier-fleur coupée suggéraient un intérêt particulier à étudier le photocontrôle du débourrement chez cette espèce. Ils appelaient aussi à de nécessaires approfondissements : peut-on généraliser cette réponse au genre *Rosa* ? A d'autres genres ? Quelles sont les bandes du spectre lumineux contrôlant le débourrement ? Quels en sont les photorécepteurs et les voies de signalisation empruntées ? Enfin, quels sont les processus du débourrement photo-modulés ? C'est à ces questions que nous avons tenté de répondre au cours de ces recherches.

Nos travaux ont confirmé le besoin absolu en lumière des bourgeons de rosiers pour produire un débourrement et montré que ce photocontrôle s'exerce sur au moins deux de ses composantes, i.e. la croissance des jeunes feuilles préformées et l'activité organogénique du méristème apical caulinaire. La lumière agirait en modulant le métabolisme glucidique, les flux hydriques et l'élongation cellulaire. Nous discutons ci-dessous ces résultats et esquissons, en conclusion un modèle du photocontrôle du débourrement.

- **Des voies dépendante et indépendante de la lumière contrôlent le débourrement des bourgeons chez les plantes**

Placés à l'obscurité, les bourgeons de peuplier (*Populus tremula* x *Populus tremuloïdes* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L. 'Tresor' hybrid F1) et *Arabidopsis thaliana* débourrent et produisent des rameaux secondaires. Au contraire, les bourgeons de rosier sont totalement inhibés et requièrent une source lumineuse (même faible puisqu'une irradiance de 2 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ est suffisante) pour débourrer. Bien que le nombre d'espèces que nous ayons testées soit restreint, il apparaît clairement qu'il existe deux groupes chez les plantes : les plantes ayant un besoin absolu de lumière pour le débourrement et les plantes indifférentes. Ce résultat est original et n'est pas sans rappeler les catégories de plantes photosensibles ou non lors de la germination ou de la floraison (Chory *et al.*, 1996 ; Finkelstein *et al.*, 2008).

Afin d'étayer plus fortement notre observation, il serait utile d'élargir l'expérience à des genres plus nombreux, mais aussi de vérifier si le photocontrôle observé dans le genre *Rosa* n'est pas une caractéristique étendue dans la famille des Rosacées.

D'un point de vue moléculaire, si l'on se réfère aux voies de contrôle connues du débourrement (endo-, para- et éco-dormances), il apparaît alors nécessaire d'ajouter au sein des éco-dormances, ce besoin absolu de lumière. En effet, même si l'on considère que l'obscurité permanente n'est pas une condition rencontrée dans la nature pour les bourgeons, l'absence totale de débourrement et des processus qui l'accompagnent (croissance, organogenèse, métabolismes...), comme nous l'avons montré chez le rosier, souligne l'importance majeure du facteur lumineux dans le contrôle du débourrement et suggère un contrôle amont de la lumière sur les processus physiologiques mis en œuvre dans le débourrement.

Pour d'autres espèces comme le peuplier (*Populus tremula* x *Populus tremuloïdes* L.), la tomate (*Solanum lycopersicum* L. 'Tresor' hybrid F1) et *Arabidopsis thaliana*, le débourrement emprunterait une voie indépendante de la lumière. Il apparaît alors intéressant de comparer cette voie avec la voie-dépendante pour identifier les chaînons communs et distincts qui conduisent au débourrement. Ce type d'étude est beaucoup plus avancé pour ce qui concerne la germination et la floraison, et les résultats obtenus peuvent certainement offrir des pistes intéressantes pour l'étude du débourrement. Dans le cas des graines à photosensibilité positive (germination à la lumière), les formes actives des phytochromes Pfr stimuleraient l'hydrolyse des parois des cellules de l'albumen, via l'action des gibbérellines (Arana *et al*., 2006). De manière intéressante, chez des espèces à photosensibilité négative (germination à l'obscurité, inhibition à la lumière), la présence d'un stock préexistant de formes actives des phytochromes au sein de la graine, suffirait à déclencher la germination à l'obscurité (Taylorson, 1991). L'irradiation par des pulses de lumière Rs, en provoquant la conversion des formes Pfr en formes inactives Pr, inhibe la germination, prouvant ainsi l'existence d'un photocontrôle par les phytochromes chez ces espèces à photosensibilité négative (Shichijo *et al.*, 2005). On peut alors se demander si la présence d'un même stock de photorécepteurs préexistant à la surface des bourgeons existerait chez les espèces capables de débourrer à l'obscurité. La disponibilité d'anticorps contre certains photorécepteurs rend possible ce genre d'investigations (Hisada *et al*., 2000).

- **Un transport à courte distance du signal lumineux dans le photocontrôle du débourrement ?**

Nos expériences de masquage ont démontré que le bourgeon de rosier lui-même percevait la lumière nécessaire à son débourrement. Il n'y aurait pas, dans le cas de cette réponse photomorphogénique, de transport à longue distance du signal lumineux comme celui décrit pour le dé-étiolement de l'hypocotyle entre les cotylédons et l'hypocotyle chez le concombre (*Cucumis sativus*, Black & Shuttleworth, 1974), pour l'évitement de l'ombre entre les feuilles et la tige chez la moutarde (*Sinapis alba* : Morgan *et al.*, 1980 ; Casal & Smith, 1988) ou lors de l'induction florale, entre le mésophylle et le méristème apical d'*Arabidopsis thaliana* (Endo *et al.*, 2005). Aucune autre étude n'a, à ce jour, adressé cette question pour le débourrement des bourgeons. L'hypothèse parfois avancée confère aux feuilles le rôle d'organes récepteurs comme pour les autres processus photomorphogéniques, mais sans démonstration expérimentale (Bou-Torrent *et al*., 2008). Il faut toutefois être prudent dans la généralisation d'une réponse à courte distance dans le photocontrôle du débourrement : en effet, il a aussi été montré des réponses à courte distance chez certaines espèces dans le cas de l'évitement de l'ombre (*Vigna sinensis* L. : Lecharny & Jacques, 1980, Garcia-Martinez *et al.*, 1987 ; *Glycine max*, Buck & Vince-Prue, 1985). Des expériences similaires à celles que nous avons menées chez le rosier devront être conduites chez d'autres espèces et genres avant de conclure. Par ailleurs, nos expériences ayant été menées sur des plantes défoliées, le rôle des feuilles n'a pas été étudié : si la perception de la lumière par le bourgeon a bien été démontrée dans nos travaux, un rôle secondaire des feuilles dans la modulation du photocontrôle du débourrement ne peut être exclu pour le moment.

Nous avons pu mettre en évidence, qu'en présence de lumière, deux des composantes-clés du débourrement, i.e. la croissance des jeunes feuilles préformées et l'activité organogénique du méristème, étaient stimulées. On peut s'interroger sur la manière dont le signal lumineux est transporté depuis la surface réceptrice du bourgeon jusqu'aux organes plus internes que sont les jeunes feuilles et le méristème. Les écailles périphériques et chlorophylliennes du bourgeon jouent-elles un rôle clé dans la perception de la lumière ? Au coté d'immunolocalisation des photorécepteurs, des expériences d'ablation – tout ou partie – des écailles comme celles menées sur l'épicotyle de *Vigna sinensis* L. (Garcia-Martinez *et al.*, 1987 ; Martinez-Garcia & Garcia-Martinez, 1992) pourraient permettre de déterminer leur rôle dans la perception et la transduction du signal lumineux.

On peut s'interroger sur la nature des signaux existants entre les écailles et les jeunes feuilles préformées ou le méristème. Aucune donnée bibliographique n'a, à ce jour, mis en

évidence le ou les signaux permettant l'arrivée dans le bourgeon, des flux d'eau et de sucres que nous avons constatés. Chez les graines photosensibles telles que la laitue (*Lactuca sativa* L.) ou *Arabidopsis thaliana*, la voie de signalisation de la lumière perçue par les phytochromes favorise la germination en régulant les teneurs en gibbérellines (Toyomasu *et al.*, 1994 ; Seo *et al.*, 2006, 2009 ; Oh *et al.*, 2007). Il a ainsi été émis l'hypothèse que les gibbérellines, ou l'un des précurseurs dans la voie de biosynthèse de ces hormones, constituerait l'élément mobile qui conduirait à l'induction de la germination (Garcia-Martinez *et al.*, 1987 ; Penfield *et al.*, 2005 ; Oh *et al.*, 2006, 2007). Un parallèle pourrait être fait avec le débourrement du bourgeon puisqu'il a été montré que les gibbérellines régulaient dans d'autres systèmes biologiques, le métabolisme glucidique (dégradation de l'amidon : Gubler *et al.*, 1995 ; Kaneko *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2005 ; régulation de l'expression génique d'un transporteur de saccharose : Chincinska *et al.*, 2008), ainsi que l'élongation cellulaire (régulation de l'expression génique d'expansines : Arana *et al.*, 2006 ; de Lucas *et al.*, 2008), l'activité méristématique et l'initiation des primordia foliaires chez *Arabidopsis thaliana* (Hay *et al.*, 2002), soit autant de mécanismes dont nous avons montré la photorégulation au cours du débourrement. On peut donc penser que suite à la perception de la lumière par les écailles, un signal tel que les gibbérellines serait transmis au méristème apical et aux primordia foliaires, afin de favoriser leur croissance.

- **Implication d'un ou plusieurs types de photorécepteurs dans le photocontrôle du débourrement ?**

Du fait du peu de recherches menées sur le sujet, l'identification des photorécepteurs impliqués dans le photocontrôle du débourrement chez les végétaux est une question qui reste entière. Chez le rosier, en étudiant l'impact de différentes intensités et qualités lumineuses (Rc, Rs, bleu) sur les composantes du débourrement, ainsi que sur des expressions géniques, nous pouvons avancer quelques hypothèses :

- La réaction réversible 'stimulation du débourrement sous Rc et inhibition sous Rs' que nous avons observée chez *Rosa hybrida* 'Radrazz' est caractéristique d'un photocontrôle par les phytochromes (Nagy & Schafer, 2002 ; Rockwell *et al.*, 2006). Nos résultats sur la réponse des bourgeons au gradient d'intensité lumineuse iraient aussi dans ce sens. En effet, il a été montré que davantage de la forme active des phytochromes, Pfr, s'accumulait dans les cellules végétales lorsque l'irradiance augmentait (Bae & Choi, 2008). La stimulation des processus morphogéniques (élongation des feuilles préformées, organogenèse) du débourrement ainsi que des expressions géniques de l'*IAV*, de la *SUSY* et de *RhEXP* par des

irradiances croissantes pourrait être consécutives à l'accumulation de davantage de formes actives Pfr dans ces mêmes conditions. De même, le séquençage du promoteur de *RhEXP* révèle la présence de trois boîtes régulatrices – CIACADIAN LEHLC, REALPHALGLHCB21 et SORLIPZAT – impliquées dans d'autres systèmes, dans la signalisation de la lumière par les phytochromes (Degenhardt & Tobin, 1996 ; Hudson & Quail, 2003).

- Plusieurs phytochromes existent chez les plantes et sont codés par trois (*Oryza sativa*, *Ginkgo biloba*), quatre (*Pinus sp.*) ou cinq (*Arabidopsis thaliana*) gènes (Mathews, 2006). Qu'en est-il chez le rosier ? Les différentes formes de phytochromes participent fréquemment au contrôle des mêmes processus photomorphogéniques mais sous des conditions de lumière spécifiques : basses ou fortes irradiances, photopériode, longueurs d'ondes (Bae & Choi, 2008). Alors que, pour des processus photomorphogéniques tels que le dé-étiolement de l'hypocotyle ou la floraison, on est parvenu à identifier finement le rôle de chaque forme et leurs interactions (Franklin *et al.*, 2003 ; Bae & Choi, 2008) pour le débourrement, seuls les travaux de Howe *et al.* (1998) sur peuplier (*Poplar sp.*) et de Kebrom *et al.* (2006) sur sorgho (*Sorghum bicolor*) donnent quelques indications sur l'implication d'une des isoformes de phytochromes et mettent en avant le phytochrome B dans la modulation du débourrement. La disponibilité de mutants de chacune de ces isoformes de phytochromes chez les espèces modèles (*Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum*) pourrait permettre d'approfondir la question assez aisément, si ce n'était l'absence d'un photocontrôle fort du débourrement chez ces espèces tel que nous l'avons démontré (Girault *et al.*, 2008).

- Nous avons montré l'impact de la lumière bleue sur le débourrement et ses composantes. Ceci suggère l'implication de photorécepteurs de la lumière bleue dans la transduction de ce signal. Au nombre de trois : cryptochromes, phototropines et phytochromes, il est difficile de discriminer leurs rôles respectifs sur la seule base de nos résultats. On peut toutefois noter l'absence générale de considération de la capacité des phytochromes à percevoir la lumière bleue dans la littérature. Est-ce lié aux indications de Lin (2002) sur la faible efficacité de la lumière bleue à produire la forme active Pfr ? Un des rares rapports sur le sujet confirme d'ailleurs que les phytochromes ne sont pas impliqués dans un des processus photomorphogéniques déclenchés par la lumière bleue : l'expansion des cotylédons (Ohgishi *et al.*, 2004). Concernant les phototropines, elles sont souvent désignées comme les photorécepteurs déclenchant les réponses précoces à la lumière bleue, laissant ensuite place aux cryptochromes (Li & Yang, 2007). Elles transmettent ainsi les premiers signaux

déclenchant l'inhibition de l'élongation de l'hypocotyle lors de la transition obscurité-lumière bleue. Le débourrement étant le siège d'élongations importantes (jeunes feuilles, entre-nœuds), la participation des phototropines dans cette photorégulation ne peut être exclue.

Les cryptochromes sont les autres photorécepteurs majeurs de la lumière bleue. Depuis leur identification relativement récente (Ahmad & Cashmore, 1993), leur implication dans les différents processus photomorphogéniques (floraison, développement racinaire, dé-étiolement, contrôle de l'horloge circadienne...) a été mise en évidence (Li & Yang, 2007). Aucune donnée n'existe sur leur rôle dans le débourrement. On notera toutefois qu'ils participent aussi au contrôle de l'élongation des organes (Giliberto *et al.*, 2005) et de la taille des feuilles (Platten *et al.*, 2005), deux processus majeurs du débourrement. Par ailleurs, les évidences sont de plus en plus nombreuses dans la littérature d'une interaction forte des cryptochromes avec les phytochromes dans le contrôle de la photomorphogenèse (Hennig *et al.*, 1999b ; Franklin *et al.*, 2003 ; Facella *et al.*, 2008). Au regard de ces données bibliographiques et de la forte réponse du débourrement à la lumière bleue, il semble probable que les cryptochromes interviennent dans son photocontrôle.

- **Une ou plusieurs voies de signalisation indépendantes ?**

De manière étonnante, des résultats très similaires ont été obtenus sous lumière bleue et Rc : les deux stimulent avec efficacité l'activité organogénique du méristème et la croissance des feuilles préformées. Au niveau génique, ceci se traduit aussi par l'activation de la transcription des gènes *IAV*, *SUSY* et *RhEX*P par les deux spectres lumineux pris indépendamment.

Les pousses feuillées obtenues après débourrement ne montrent pas d'aberrations dans leur développement, suggérant que les processus de croissance normalement activés sous lumière blanche le sont aussi sous l'un et l'autre spectre de bandes lumineuses bleue et Rc. Ceci suggèrerait une voie de signalisation commune pour le bleu et le Rc dans les mécanismes contrôlant le débourrement. Ceci est possible : on sait en effet qu'il existe des intégrateurs en aval des mécanismes premiers de perception de la lumière par chaque type de photorécepteur, intégrateurs qui permettent de déclencher les mêmes processus de photocontrôle du développement quelle que soit la qualité de la lumière incidente (Gyula *et al.*, 2003). C'est ainsi le cas du gène *HY5*, codant un facteur de transcription de la famille bZIP (Osterlund *et al.*, 2000 ; Cluis *et al.*, 2004). Il a été montré que des mutations du gène

HY5 chez *Arabidopsis thaliana*, entraînaient des défauts de l'inhibition de l'élongation de l'hypocotyle dans toutes les conditions lumineuses, suggérant ainsi que HY5 agissait en aval des phytochromes, des cryptochromes et des récepteurs des UV-B (Oyama *et al.*, 1997 ; Ang *et al.*, 1998 ; Ulm *et al.*, 2004). HY5 constituerait donc un facteur de transcription au rôle central, à l'interface des voies de signalisation découlant de plusieurs photorécepteurs (Jiao *et al.*, 2007 ; Lee *et al.*, 2007). Joue-t-il un même rôle dans le photocontrôle du débourrement ? Des recherches nécessitent d'être lancées dans ce sens. On peut toutefois noter dès à présent qu'il existe une forte similarité entre les processus de dé-étiolement et de débourrement : tous deux sont réprimés par l'obscurité et se déclenchent à la lumière, sans que la qualité de la lumière n'apparaisse importante à la réalisation du processus. Ceci se traduit-il par des similarités dans les voies de signalisation ?

- **Métabolisme glucidique, flux d'eau et élongation cellulaire, cibles de la signalisation par la lumière**

De nombreuses études indépendantes menées chez différentes espèces ont mis en évidence les rôles du métabolisme glucidique, des flux hydriques et de l'élongation cellulaire dans le débourrement. Ces trois processus contribuent, ensemble, à la croissance et au développement qui accompagnent le débourrement. Nos recherches ont montré le contrôle qu'exerçait le facteur lumineux sur l'expression de ces processus.

- Photocontrôle des flux d'eau :

En présence de lumière, la quantité d'eau augmente fortement au sein du bourgeon dès les premières vingt-quatre heures suivant la décapitation. Au contraire, à l'obscurité, bien qu'une légère augmentation soit mesurée aussitôt la décapitation, la teneur en eau ne varie plus après 24 h. Les flux d'eau vers le bourgeon semblent donc être fortement restreints par l'absence de lumière.

Le rôle de l'eau au cours du débourrement a été mis en évidence chez différentes espèces. Ainsi, chez le frêne (*Fraxinus excelsior* L.), les divisions cellulaires sont bloquées lorsque la teneur en eau est inférieure à 60 % (Cottignies, 1983, 1987). Puis, juste avant le débourrement, une augmentation rapide de la teneur en eau est observée au sein des bourgeons (*Betula pubescens* L., Rinne *et al.*, 1994 ; *Prunus persica* L.: Monet, 1983 ; Bonhomme, 1998) : celle-ci permettrait alors la reprise du métabolisme cellulaire, favorisant ainsi la croissance cellulaire. Chez le rosier, cette réhydratation est observée en présence de

lumière mais pas à l'obscurité : on peut alors se demander si le transport de l'eau jusqu'au bourgeon est inhibé par l'obscurité. L'eau peut circuler de deux façons différentes de cellules en cellules : par simple diffusion à travers les membranes cellulaires ou *via* les aquaporines. Ces protéines membranaires facilitent les mouvements d'eau (pour revue, Maurel *et al.*, 2008) et sont présentes dans la plupart des tissus, y compris les tissus méristématiques (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*, Barrieu *et al.*, 1998). Les travaux de Yooyongwech *et al*. (2008), menés chez les boutons floraux dormants de pêcher (*Prunus persica* L.), montrent une augmentation du taux de transcrits de deux aquaporines (*δTIP1* et *PIP2*) lors de la levée d'endodormance, ce qui semble indiquer que ces deux protéines joueraient un rôle important dans la reprise de l'activité cellulaire et la reprise de croissance. Mais qu'en est-il de leur photorégulation ? Des travaux récents ont montré que certaines isoformes d'aquaporines étaient fortement surexprimées en présence de lumière (*Juglans regia* L., Cochard *et al.*, 2007) et que ces protéines étaient en partie responsables de l'augmentation de la conductivité hydraulique des feuilles transférées à la lumière (*Helianthus annuus*, Nardini *et al*., 2005 ; *Juglans regia* L., Tyree *et al.*, 2005). On peut alors se demander si le flux d'eau observé au sein des bourgeons exposé à la lumière est-il conditionné au photocontrôle d'aquaporines.

- Photocontrôle du métabolisme glucidique :

Nos résultats indiquent que les expressions des gènes codant des enzymes de dégradation du saccharose, i.e. l'IAV et la SUSY, sont stimulées au sein du bourgeon en présence de lumière. De plus, l'activité enzymatique de l'IAV suit le profil observé pour l'expression génique. L'éclairement offrirait donc des conditions permissives pour une dégradation du saccharose au sein de l'organe. Cette dégradation se traduit, comme nous l'avons mesuré, par une augmentation de la quantité de glucose dans le bourgeon et contribue à fournir l'énergie nécessaire à la croissance cellulaire, *via* la glycolyse, ainsi que les briques élémentaires des parois en expansion.

Alors qu'à l'obscurité le bourgeon épuise rapidement ses réserves en saccharose, on note dès 24 h de lumière, une forte augmentation des quantités de saccharose par bourgeon. S'agit-il d'une néo-synthèse ou d'un transport de saccharose depuis la tige ?

- Dans le cas d'une néo-synthèse de saccharose, celui-ci pourrait être formé suite (1) à la dégradation de l'amidon ou (2) à partir des monosaccharides (glucose et fructose), présents dans le bourgeon suite à l'action de la Saccharose-Phosphate Synthase (SPS) et/ou de la

SUSY. Nos résultats sur les teneurs en amidon au sein des bourgeons laissent penser que la première possibilité est peu envisageable. En effet, une augmentation de la teneur en amidon au sein des bourgeons est mesurée après 48 h de lumière, suggérant une néo-synthèse d'amidon, ce qui irait à l'encontre de l'augmentation de la teneur en saccharose mesurée au même instant dans le bourgeon. Concernant la néo-synthèse de saccharose à partir de fructose et de glucose sous l'action de la SUSY et/ou de la SPS, elle semble également peu probable : la forte augmentation de la teneur en glucose mesurée dans le bourgeon va à l'encontre d'une mobilisation de ce sucre pour la formation de saccharose.

- Un transport de saccharose depuis la tige paraît au contraire probable, la littérature montrant que le bourgeon en croissance se comporte comme un organe puits (Tort, 1996 ; Le Hir *et al.*, 2005). L'augmentation de la teneur en saccharose au sein de la portion de tige sous-jacente au bourgeon au cours du débourrement va dans ce sens. L'expression ou l'activité des transporteurs de sucres sont-ils alors sous photocontrôle ? Les résultats de la bibliographie dans d'autres systèmes biologiques indiquent que certains transporteurs de sucres, notamment de saccharose, voient effectivement leur expression génique régulée par la lumière (*Daucus carota* L., Shakya & Sturm, 1998 ; *Oryza sativa*, Matsukura *et al*., 2000 ; *Arabidopsis thaliana*, Stadler *et al*., 2003 ; *Solanum tuberosum*, Chincinska *et al.*, 2008). Des investigations dans le cadre du débourrement des bourgeons devront être menées dans ce sens.

Il est également intéressant de noter la régulation, par les conditions lumineuses, de l'expression d'un gène lié au métabolisme du sorbitol. Contrairement aux autres gènes étudiés dans ce travail, le gène codant la NAD-SDH est le seul pour lequel l'expression est stimulée à l'obscurité. Quelle est la signification d'une telle régulation ? La NAD-SDH, permet la conversion réversible du sorbitol en fructose. Nos dosages d'activité au cours du débourrement suggèrent que l'enzyme fonctionne plutôt dans le sens d'une synthèse de sorbitol, comme c'est le cas chez le fraisier (*Fragaria ananassa)*, espèce génétiquement proche du rosier, au cours de la maturation de la fraise (Sutsawat *et al*., 2008). Si tel était le cas, on peut s'interroger sur le rôle d'une synthèse de sorbitol au sein du bourgeon à l'obscurité ? L'obscurité permanente telle que nous l'appliquons, est vraisemblablement une condition très stressante pour la plante. Or le sorbitol est un sucre-alcool fréquemment associé dans la littérature à la réponse aux stress. Selon Loescher (1987) et Pommerrenig *et al.* (2007), ce sucre contribuerait en conditions de stress à maintenir la pression osmotique requise pour la survie des cellules. Dans le bourgeon à l'obscurité, le métabolisme du

saccharose qui joue en conditions permissives, un rôle majeur dans la régulation de l'osmolarité, est fortement inhibé. En retour, les flux d'eau vers le bourgeon sont limités. Le métabolisme du sorbitol prend-il alors le relai du métabolisme du saccharose afin de réguler l'osmolarité cellulaire, comme suggéré chez le plantain (*Plantago major L.)* sous stress salin *(*Pommerrenig *et al.*, 2007) ? Ou, comme récemment proposé par Morais de Sousa *et al.*, (2008), chez le maïs (*Zea mays)*, l'activité NAD-SDH qui conduit à la production de sorbitol permet-elle essentiellement de régénérer le NAD^+, nécessaire au maintien du statut énergétique de la cellule, au travers de la glycolyse ? Les dosages que nous avons effectués par HPLC sur les bourgeons de rosier n'ont pas permis de détecter le sorbitol. Sommes-nous alors plutôt dans le cas, où de très faibles variations des teneurs en sorbitol participent à un rôle signal de ce sucre, comme pour le tréhalose (Schluepmann *et al*., 2003) ? Ceci a été suggéré chez la tomate (*Solanum lycopersicum*) où le sorbitol est aussi détecté en faibles quantités et où le stress provoqué par l'attaque d'un agent pathogène entraine la stimulation de l'expression d'un gène codant une NAD-SDH (Ohta *et al*., 2005). Des investigations approfondies sur le rôle du métabolisme du sorbitol dans le photocontrôle du débourrement sont nécessaires pour répondre à ces questions.

- Photocontrôle de l'élongation cellulaire :

Le débourrement nécessite la croissance des entre-nœuds et des feuilles préformées et, chez le rosier, s'accompagne de la néoformation de nouveaux primordia foliaires. Tous ces processus de croissance sont le fruit de divisions et d'élongations cellulaires. L'élongation cellulaire est en partie le résultat de l'action des expansines, protéines favorisant le relâchement de la paroi pecto-cellulosique (McQueen-Mason & Cosgrove, 1995 ; Sampedro & Cosgrove, 2005). Nous avons montré qu'une expansine RhEXP de type α, s'exprimait dans le méristème *sensu-stricto* et dans les jeunes feuilles, et était fortement photo-régulée au cours du débourrement. L'expression du gène *RhEXP* est extrêmement réduite à l'obscurité, alors qu'à la lumière, son expression est forte tout au long du débourrement. L'analyse du promoteur a révélé la présence de nombreuses boîtes de régulation par la lumière ce qui explique les fortes variations de la transcription de ce gène observées en fonction des conditions d'éclairement. Ces résultats montrent donc que le photocontrôle du débourrement passe par la photorégulation de l'expansion pariétale.

Comme souligné précédemment, deux des boîtes cis-régulatrices identifiées dans le promoteur de *RhEXP* sont désignées dans la littérature comme des cibles de la signalisation par les phytochromes. L'induction de la transcription de *RhEXP* par la lumière Rc va dans ce

sens. Une expérience complémentaire, que nous devrons mener, sera de vérifier la photo-réversibilité de cette induction sous lumière Rs.

Les résultats que nous avons obtenus sur le rôle d'une expansine dans la photo-modulation du débourrement sont originaux. Ils ne sont toutefois pas sans rappeler les observations faites dans le cadre de la germination des graines. En effet, il a été montré que la forte croissance du coléoptile d'avoine (*Avena sativa* L.) à l'obscurité était corrélée à une sensibilité croissante des parois cellulaires aux expansines (Cosgrove & Li, 1993) et que le dé-étiolement de l'hypocotyle d'*Arabidopsis thaliana* à la lumière s'accompagnait de la répression rapide de la transcription d'une β-expansine (Tepperman *et al*., 2001). En terme de qualité de lumière, il a été montré que la lumière Rc stimulait la transcription de gènes d'expansines dans la graine de datura (*Datura ferox* L.), en cours de germination et que cet effet était annulé sous lumière Rs (Mella *et al*., 2004). Enfin, chez la tomate (*Solanum lycopersicum*), dont la graine germe à l'obscurité, les transcrits d'une expansine s'accumulent dans la zone d'émergence de la radicule à l'obscurité et cette accumulation est inhibée par le Rs (Chen & Bradford, 2000). Il est donc tentant d'établir un parallèle entre la photorégulation de l'expansion cellulaire au cours de la germination et celle du débourrement.

Des avancées nombreuses ont notamment été faites ces dernières années, et mettent en avant les interactions entre le contrôle par la lumière et celui par les gibbérellines dans l'expansion cellulaire au cours de la germination et du développement de la plantule. Ces interactions agissent sur la modulation de gènes contrôlant l'expansion pariétale, notamment d'expansines (Arana *et al*., 2006 ; de Lucas *et al*., 2008). Il sera donc très intéressant à l'avenir de s'interroger sur une similaire interaction lumière-gibbérellines-expansines dans le processus du débourrement.

Par ailleurs, d'autres gènes participant à la régulation de l'expansion cellulaire tels ceux codant les xyloglucan-endotransglycosidases/hydrolases (XTH, Sampedro & Cosgrove, 2005 ; Vissenberg *et al*., 2005) présentent une photorégulation (Ma *et al*., 2001 ; Folta *et al*., 2003 ; Sasidharan *et al.,* 2008) et il serait nécessaire d'étendre l'étude du photocontrôle de l'élongation cellulaire au cours du débourrement à ces autres gènes.

Conclusion et Perspectives

Ce travail avait pour but d'étudier le photocontrôle du débourrement du bourgeon et d'identifier les processus photorégulés. Plusieurs approches, à différentes échelles, ont été menées en parallèle.

La caractérisation morphologique du débourrement sous différentes conditions lumineuses (obscurité, intensités et qualités lumineuses) a confirmé le besoin absolu de lumière pour le débourrement chez six variétés de rosier appartenant à trois espèces. Nous avons démontré que ce besoin absolu de lumière n'était pas générique, et qu'une voie indépendante de la lumière existait chez les végétaux. Nous avons également pu montrer que le bourgeon était, l'organe percepteur de la lumière nécessaire au débourrement. Afin de mieux caractériser l'influence de la lumière sur le processus de débourrement, deux de ses composantes-clés, i.e. l'activité organogénique du méristème et la croissance des jeunes feuilles préformées, ont fait l'objet d'études plus approfondies et il a ainsi été observé que ces deux mécanismes étaient eux-aussi photorégulés.

L'étude de l'état d'hydratation du bourgeon et de la partie de tige sous-jacente a mis en évidence une bonne corrélation entre la teneur en eau et la capacité de croissance des bourgeons en présence de lumière. De la même façon, nous avons montré que la lumière favorisait la mobilisation des réserves glucidiques au sein du bourgeon, en régulant l'expression génique d'enzymes impliquées dans la dégradation du saccharose, i.e. l'IAV et la SUSY. Il a aussi été démontré que la lumière agissait sur la capacité d'élongation cellulaire en régulant l'expression génique d'une expansine impliquée dans le relâchement de la paroi cellulaire. La présence de nombreux éléments de réponse à la lumière dans le promoteur de ce gène, suggère une voie de signalisation courte entre la perception de la lumière et la régulation transcriptionnelle de ce gène.

Ainsi, l'ensemble de nos résultats indiquent que trois des processus du débourrement, i.e. le métabolisme glucidique, les flux hydriques et l'élongation cellulaire, sont sous photocontrôle et, qu'ensemble, ils participent à la régulation de la croissance des jeunes feuilles préformées ainsi qu'à la régulation de l'activité organogénique du méristème au cours du débourrement à la lumière.

L'ensemble des résultats obtenus, ainsi que des données bibliographiques sur la photomorphogenèse, permettent alors de proposer un modèle du photocontrôle du débourrement (Figure 65).

Selon ce modèle, les photorécepteurs (PHY, CRY, et/ou PHOT) présents au sein des écailles du bourgeon percevraient la lumière et la ou les voies de signalisation en découlant permettrai(en)t l'envoi d'un ou de plusieurs signaux vers les organes situés au sein du bourgeon, i.e. les jeunes feuilles préformées et le méristème apical caulinaire. Les travaux menés chez les graines suggèrent qu'un de ces signaux pourrait être de nature hormonale, notamment une gibbérelline, ou un précurseur (Garcia-Martinez *et al*., 1987 ; Penfield *et al.*, 2005 ; Oh *et al*., 2006, 2007).

Un ensemble de processus physiologiques interdépendants seraient alors induits. Nous avons pu montrer l'implication, chez le rosier, du métabolisme glucidique, des flux hydriques et de l'élongation cellulaire dans le débourrement, ainsi que leur photocontrôle. La transduction du signal lumineux provoquerait la dégradation du saccharose présent dans le bourgeon et stimulerait le transport des réserves en ce sucre de la tige vers le bourgeon. L'augmentation de la pression osmotique des cellules du bourgeon qui en résulterait, entrainerait un afflux d'eau dans le bourgeon offrant des conditions physiologiques propices à la croissance. Une possible photorégulation des aquaporines faciliterait ce processus.

L'augmentation de la turgescence cellulaire ainsi que la photostimulation de gènes impliqués dans le relâchement de la paroi, comme les expansines, enclencheraient le processus d'élongation cellulaire accompagnant la croissance des feuilles préformées et l'activité organogénétique du méristème. En parallèle ou consécutivement, la stimulation par la lumière d'autres mécanismes de croissance (divisions cellulaires ?) et de différentiation aboutirait au débourrement.

A l'obscurité, l'absence de stimulation des flux d'eau et de sucres ainsi que de la dégradation du saccharose ne permettrait pas d'apporter les ressources énergétiques (ATP), les précurseurs de paroi (UDP-Glucose) et les conditions physiologiques (turgescence cellulaire) nécessaires au développement. La répression de l'expression de l'expansine et probablement d'autres gènes de la régulation de l'expansion pariétale verrouillerait toute possibilité de croissance cellulaire. En réponse au stress imposé par l'obscurité, le métabolisme du sorbitol serait enclenché, pour contribuer à la survie cellulaire.

Le travail que nous avons mené, ouvre de nombreuses perspectives de recherche pour avancer dans la compréhension des mécanismes du photocontrôle du débourrement. En démontrant le fort impact de la lumière sur le débourrement chez le rosier, il permet de plus d'orienter les recherches de l'UMR SAGAH sur l'impact de ce facteur de l'environnement sur l'élaboration de l'architecture de la plante entière.

Les perspectives d'études envisagées sont les suivantes :

- **Etude de la voie de transduction du signal lumineux au cours du débourrement**

Nous avons démontré que le bourgeon est l'organe percepteur de la lumière utile au débourrement. C'est donc dans cette entité qu'il faut aller chercher les acteurs de la voie de signalisation de la lumière conduisant au débourrement. Chez le rosier, l'absence de mutants identifiés de photorécepteurs, la difficulté à produire des plantes transgéniques limitent les outils d'investigation. Toutefois, la réponse absolu au besoin de lumière obtenu chez cette espèce et toute la caractérisation effectuée au cours de ce travail, encouragent à poursuivre des travaux chez cette espèce. En s'appuyant sur les gènes dont nous avons identifiés la modulation de l'expression par la lumière, notamment l'expansine RhEXP pour laquelle nous avons séquencé plus de 1000 pb du promoteur, une approche de type simple hybride puis double hybride va être lancée afin d'identifier les facteurs de transcriptions et leurs protéines partenaires, agissant sur ce gène. Par ailleurs, il serait intéressant d'identifier parmi les boîtes putatives de photorégulation séquencées dans le promoteur de *RhEXP*, les éléments cis-régulateurs majeurs intervenant dans le photocontrôle de l'expression de ce gène. Des expériences de délétion sur promoteur associées à des études d'expression transitoire sont envisagées.

Par ailleurs, des anticorps monoclonaux contre certains photorécepteurs ayant été synthétisés dans d'autres espèces (Hisada *et al*., 2000), il est envisageable d'étudier leur réaction croisée avec les photorécepteurs de rosier afin de contribuer à leur localisation dans le bourgeon et notamment les écailles.

Enfin en s'appuyant sur les espèces modèles pour lesquelles on dispose de mutants de photorécepteurs (arabidopsis, tomate, pois ...) et de puces à ADN, des avancées importantes peuvent être obtenues : en effet, même si ces plantes ne présentent pas un besoin absolu de lumière pour débourrer, le phénotype d'étiolement des pousses que nous avons observé à

l'obscurité, prouve que certains processus du débourrement sont sensibles aux conditions de lumière. Ainsi, l'étude phénotypique du débourrement chez des mutants de photorécepteurs, l'hybridation d'ARN de ces bourgeons sur des puces à ADN de plantes sauvages offrent des perspectives séduisantes pour l'identification d'autres acteurs de la signalisation de la lumière au cours du débourrement.

- **Recherche des mécanismes précocement régulés chez le rosier**

Les mesures que nous avons effectuées sur le métabolisme glucidique, flux d'eau, élongation cellulaire montrent des différences significatives que ce soit en terme de teneurs en métabolites ou eau, d'activités protéiques ou géniques, essentiellement après 24 h de traitements lumineux. Or les données de la bibliographie dans d'autres systèmes biologiques rapportent que le signal lumineux produit des régulations fortes d'activités transcriptionnelles quelques minutes à heures après le traitement (Tepperman *et al*., 2001, 2004 ; Cochard *et al.*, 2007). Il est donc probable que d'autres gènes des voies que nous avons étudiées (métabolisme des sucres, expansion cellulaire) soient plus précocement régulés, de même que d'autres mécanismes. Afin de construire la chaîne d'évènements qui conduit de la perception par le bourgeon du signal lumineux au débourrement, il est nécessaire d'élargir nos recherches à ces régulations précoces. Ce travail a été entamé au cours de cette thèse par une étude sans *a priori* employant la technique de cDNA-AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). L'étude a été réalisée à partir d'ARNtx de bourgeons de plantes expérimentales *Rosa hybrida* 'Radrazz' placées, après décapitation, sous lumière blanche ou à l'obscurité pendant 1, 6 ou 10 h. Un peu plus de 1000 produits amplifiés, d'une taille moyenne d'environ 200 pb, ont montré une expression différentielle en fonction du traitement lumineux et de sa durée. A l'heure actuelle, près de 400 produits amplifiés ont été clonés et séquencés parmi ceux différentiellement exprimés dès 1 h après la décapitation. Parmi ces séquences, des gènes codant une β-glucosidase, une UDP-glucose déshydrogénase et une pectinestérase ont notamment été identifiés. Ces gènes interviennent dans la modification de la paroi pectocellulosique (Brzobohaty *et al.*, 1993 ; Seitz *et al*., 2000 ; Johansson *et al*., 2002 ; Derbyshire *et al*., 2007) et participent donc à la croissance cellulaire. Ces premiers résultats confirment le rôle important de la régulation de l'expansion cellulaire dans le photocontrôle du débourrement et soulignent sa régulation très précoce. Ils confortent le choix de ce processus pour la recherche des acteurs amont de la voie de signalisation de la lumière dans le débourrement.

Ces études moléculaires que nous engageront chez le rosier, seront facilitées par l'obtention ces prochains mois de plus de 17000 unigènes de rosier (soit environ 50 % du génome), séquencés dans le cadre d'un projet AIP, mené conjointement par les cinq laboratoires français étudiant cette même espèce.

- **Etude des flux : eau et sucres**

Nos résultats montrent des variations importantes des teneurs en eau et en sucres au sein des bourgeons, en fonction des conditions lumineuses. Cette eau et ces sucres provenant vraisemblablement majoritairement de la tige portant le bourgeon, il est alors intéressant de savoir si les activités de transports associées sont photo-modulées. Des travaux de recherches ont été entamés dans ce sens au sein de l'équipe. Des transporteurs de sucres du rosier ont été clonés au laboratoire et font l'objet d'un travail de caractérisation et de suivi de l'expression génique au cours du débourrement sous différentes conditions lumineuses (C. Henry, Thèse 2007-2010). Concernant les flux d'eau, des travaux préliminaires ont permis de cloner une aquaporine de rosier dont l'expression génique semble être stimulée à la lumière. Des essais ont été menés en collaboration avec le S.C.A.S. (Service Commun d'Analyses Spectroscopiques de l'Université d'Angers) afin de visualiser l'afflux d'eau et son statut (eau libre, eau liée) au sein du bourgeon par I.R.M. (Imagerie par Résonance Magnétique). Cette technique pourra être envisagée par la suite pour l'étude fine de l'alimentation hydrique du bourgeon au cours du débourrement, et en fonction des conditions lumineuses.

- **Photorégulation de la signalisation hormonale au cours du débourrement**

Par leurs rôles majeurs dans le contrôle des processus de morphogenèse, et de dormances des bourgeons : endodormance et paradormances - dominance apicale, cartographie de débourrement le long d'un axe - (Horvath *et al.*, 2003 ; Booker *et al.*, 2004 ; Blaskeslee *et al.*, 2005 ; Stirnberg *et al.*, 2002, 2007 ; Gomez-Roldan *et al.*, 2008 ; Ferguson & Beveridge, 2009) les hormones (auxine, cytokinines, gibbérellines, strigolactones, acide abscissique) apparaissent comme des acteurs potentiels de premier ordre dans la photorégulation du débourrement. Plusieurs travaux soulignent d'ailleurs que la signalisation hormonale est effectivement modifiée par la perception de la lumière (Folta *et al.*, 2003 ; Penfield *et al.*,

2005 ; Salisbury *et al.*, 2007). Nous avons mentionné précédemment le cas de la photorégulation des gibbérellines (Garcia-Martinez *et al.*, 1987 ; Penfield *et al.*, 2005 ; Oh *et al.*, 2006, 2007). Des travaux récents suggèrent aussi un impact de la lumière sur les transporteurs d'auxine (Colon-Carmona *et al.*, 2000 ; Nagashima *et al.*, 2008). Or, il a été montré que le débourrement d'un bourgeon est conditionné par la diminution de la teneur en auxine de la tige à proximité de ce bourgeon (Beveridge, 2000), puis par un efflux de l'auxine contenu par ce bourgeon vers la tige. Selon le récent modèle proposé par Ferguson & Beveridge (2009), cet efflux contribuerait à la vascularisation de la connexion bourgeon–tige, autorisant l'alimentation soutenue du bourgeon en nutriments. L'absence de débourrement à l'obscurité est-elle alors liée à un blocage du transport de l'auxine ?

Il apparaît donc essentiel d'adresser la question de la photorégulation des signalisations hormonales au cours du débourrement. Ce travail est entamé au sein de l'équipe au travers une thèse sur la photomodulation du métabolisme des gibbérellines au cours du débourrement, et sera complété par des recherches sur l'impact de la lumière sur leurs voies de signalisation. Dans ce cadre, une attention particulière sera portée à l'interaction lumière/expansion cellulaire/gibbérellines.

Parallèlement, une étude post-doctorale est menée, qui analyse l'effet de la lumière sur l'expression des gènes de la voie de synthèse et de signalisation des strigolactones sur la cartographie du débourrement le long d'un axe de rosier.

Enfin, des recherches vont être entamées sur l'impact de la lumière sur l'auxine et son transport au cours du débourrement.

NB: Les recherches sur la photorégulation des gibbérellines et des strigolactones sont engagées en collaboration avec l'UMR Genhort.

L'étude cDNA-AFLP décrite plus haut contribuera par ailleurs, sans doute à l'identification d'acteurs des voies de signalisation hormonale, photorégulés au cours du débourrement.

- **Impact de la lumière sur l'élaboration de l'architecture de la plante entière**

L'impact de la lumière sur la capacité de débourrement des bourgeons montré dans ce travail, suggère que ce facteur de l'environnement va jouer un rôle important dans

l'élaboration de l'architecture de la plante entière en modulant la production de rameaux latéraux. Ceci peut alors avoir des conséquences sur la qualité esthétique de la plante.

Des travaux préliminaires menés au sein de l'équipe, montre en effet que l'intensité et la qualité de la lumière incidente module certains paramètre de croissance de la plante adulte (ramification, longueur d'entre-nœuds...). Afin de quantifier précisément ces effets, deux thèses ont débuté en 2009 sur ces aspects avec pour objectifs principaux, la cartographie de la lumière au sein du couvert végétal que constitue une culture de rosier, l'identification de paramètres de croissance modulés par la lumière au cours du développement de la plante ramifiée et l'élaboration de lois de réponse. Ces lois de réponse alimenteront le modèle structure-fonction du développement du rosier-buisson auquel travaille l'équipe.

Références bibliographiques

- A -

Ahmad M, Cashmore AR (1993) *HY4* gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. Nature **366:** 162-166

Ahmad M, Jarillo JA, Smirnova O, Cashmore AR (1998) The CRY1 blue light photoreceptor of Arabidopsis interacts with phytochrome A *in vitro*. Molecular Cell **1:** 939-948

Al-Sady B, Ni W, Kircher S, Schafer E, Quail PH (2006) Photoactivated phytochrome induces rapid PIF3 phosphorylation prior to proteasome-mediated degradation. Molecular Cell **23:** 439-446

Ang L, Chattopadhyay S, Wei N, Oyama T, Okada K, Batschauer A, Deng X-W (1998) Molecular interaction between COP1 and HY5 defines a regulatory switch for light control of Arabidopsis development. Molecular Cell **1:** 213-222

Arana MV, de Miguel LC, Sanchez RA (2006) A phytochrome-dependent embryonic factor modulates gibberellin responses in the embryo and mycropylar endosperm of *Datura ferox* seeds. Planta **223:** 847-857

Archbold DD (1999) Carbohydrate availability modifies sorbitol dehydrogenase activity of apple fruit. Physiologia Plantarum **105:** 391-395

Arguello-Astorga G, Herrera-Estrella L (1998) Evolution of light-regulated plant promoters. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **49:** 525-555

Aue HL, Lecomte I, Pétel G (2000) Changes in parameters of the plasmalemma ATPase during peach vegetative bud dormancy. Biologia Plantarum **43:** 25-29

Aukerman MJ, Hirschfeld M, Wester L, Weaver M, Clack T, Amasino RM, Sharrock RA (1997) A deletion in the PHYD gene of the Arabidopsis Wassilewskija ecotype defines a role for phytochrome D in red/far-red light sensing. The Plant Cell **9:** 1317-1326

- B -

Bachman GR, McMahon MJ (2006) Day and night temperature differential (DIF) or the absence of far-red light alters cell elongation in 'Celebrity White' petunia. Journal of the American Society for Horticultural Science **131:** 309-312

Bae G, Choi G (2008) Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins. Annual Review of Plant Biology **59:** 281-311

Bahmani I, Hazard L, Varlet-Grancher C, Betin M, Lemaire G, Matthew C, Thom ER (2000) Differences in tillering of long- and short-leaved perennial ryegrass genetic lines under full light and shade treatments. Crop Science **40:** 1095-1102

Bainbridge K, Sorefan K, Ward S, Leyser O (2005) Hormonally controlled expresion of the Arabidopsis *MAX4* shoot branching regulatory gene. Plant Journal **44:** 569-580

Banerjee R, Batschauer A (2005) Plant blue-light receptors. Planta **220:** 498-502

Bantog N, Yamada K, Niwa N, Shiratake K, Yamaki S (2000) Gene expression of NAD^+-dependent sorbitol dehydrogenase and $NADP^+$-dependent sorbitol-6-phosphate dehydrogenase during development of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) fruit. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science **69:** 231-236

Barnes C, Bugbee B (1992) Morphological responses of wheat to blue light. Journal of Plant Physiology **139:** 339-342

Barratt PDJ, Barber L, Kruger NJ, Smith AM, Wang TL, Martin C (2001) Multiple, distinct isoforms of sucrose synthase in pea. Plant Physiology **127:** 655-664

Barrieu F, Thomas D, Marty-Mazars D, Charbonnier M, Marty F (1998) Tonoplast intrinsic proteins from cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*): immunological analysis, cDNA cloning and evidence for expression in meristematic tissues. Planta **204:** 335-344

Barthélémy D, Edelin C, Halle F (1989) Tropical Forests. *In:* Botanical dynamics, speciation and diversity. LB Holm-Nielsen, H Basler, eds. Academic Press, London, pp 89-100

Bartlett GA, Remphrey WR (1998) The effect of reduced quantities of photosynthetically active radiation on *Fraxinus pennsylvanica* growth and architecture. Canadian Journal of Botany **76:** 1359-1365

Batschauer A (1993) A plant gene for photolyase : an enzyme catalyzing the repair of UV-light-induced DNA damage. The Plant Journal **4:** 705-709

Batschauer A (1999) Light perception in higher plants. Cellular and Molecular Life Sciences **55:** 153-165

Battey NH (2000) Aspects of seasonality. Journal of Experimental Botany **51:** 1769-1780

Baud S, Vaultier MN, Rochat C (2004) Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in *Arabidopsis*. Journal of Experimental Botany **55:** 397-409

Bauer D, Viczian A, Kircher S, Nobis T, Nitschke R, Kunkel T, Panigrahi KCS, Adam E, Fejes E, Schäfer E, Nagy F (2004) Constitutive Photomorphogenesis 1 and multiple photoreceptors control degradation of Phytochrome Interacting Factor 3, a transcription factor required for light signaling in *Arabidopsis*. The Plant Cell **16:** 1433-1445

Belfield EJ, Ruperti B, Roberts JA, McQueen-Mason S (2005) Changes in expansin activity and gene expression during ethylene-promoted leaflet abscission in *Sambucus nigra*. Journal of Experimental Botany **56:** 817-823

Bellaloui N, Brown PH, Dandekar AM (1999) Manipulation of in vivo sorbitol production aleter boron uptake and transport in Tobacco. Plant Physiology **119:** 735-741

Bennett T, Sieberer T, Willett B, Booker J, Luschning CL, Leyser O (2006) The *Arabidopsis MAX* pathway controls shoot branching by regulating auxin transport. Current Biology **16:** 553-563

Bergmeyer HV, Bernt E (1974) Sucrose. *In:* Methods of enzymatic analysis. HV Bergmeyer ed, Academic Press, New York, pp 1176-1179

Beveridge CA, Symons GM, Turnbull C (2000) Auxin inhibition of decapitation-induced branching is dependent on graft-transmissible signals regulated by genes *rms1* and *rms2*. Plant Physiology **123:** 689-697

Beveridge CA, Mathesius U, Rose RJ, Gresshoff PM (2007) Common regulatory themes in meristem development and whole-plant homeostasis. Current Opinion in Plant Biology **10:** 44-51

Bieleski RL (1982) Sugar alcohols. *In:* Plant carbohydrates. I. Intracellular carbohydrates. FA Loewus, W Tanner eds, Encyclopedia of Plant Physiology, New series 13A. Springer-Verlag, Berlin, pp 158-192

Bieleski RL, Redgwell RJ (1985) Sorbitol versus sucrose as photosynthesis and translocation products in developing apricot leaves. Australian Journal of Plant Physiology **12:** 657-668

Bieniawska Z, Barratt DHP, Garlick AP, Thole V, Kruger NJ, Martin C, Zrenner R, Smith AM (2007) Analysis of the sucrose synthase gene family in Arabidopsis. The Plant Journal **49:** 810-828

Black M, Shuttleworth JE (1974) The role of the cotyledons in the photocontrol of hypocotyl extension in *Cucumis sativus* L. Planta **117:** 57-66

Blaskeslee JJ, Peer WA, Murphy AS (2005) Auxin transport. Current Opinion in Plant Biology **8:** 494-500

Bonhomme M (1998) Physiologie des bourgeons végétatifs et floraux de pêcher dans deux situations thermiques contrastées pendant la dormance : capacité de croissance, force de puits et répartition des glucides. Thèse de Doctorat. Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, 548p.

Bonicel A, Haddad G, Gagnaire J (1987) Seasonal variations of starch and major soluble sugars in the different organs of young poplars. Plant Physiology and Biochemistry **25:** 451-459

Bonicel A, Verçosa de Médeiros Raposo N (1990) Variation of starch and soluble sugars in selected sections of poplar buds during dormancy and post-dormancy. Plant Physiology and Biochemistry **28:** 577-586

Booker J, Auldridge M, Wills S, McCarty D, Klee H, Leyser O (2004) MAX3/CCD7 is a carotenoid cleavage dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signaling molecule. Current Biology **14:** 1232-1238

Borchert R (2000) Organismic and environmental controls of bud growth in tropical trees. *In:* Dormancy in plants: from whole plant behaviour to cellular control. J.D. Viémont and J. Crabbé, eds. CABI publishing, Angers, pp 87-107

Bou-Torrent J, Roig-Villanova I, Martinez-Garcia J (2008) Light signaling: back to space. TRENDS in Plant Science **13:** 108-114

Boumaza R, Demotes-Mainard S, Huché-Thelier L, Guérin V (2009) Visual characterization of the esthetic quality of the rose bush. Journal of Sensory Studies *(sous presse)*

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry **72:** 248-254

Bredmose N (1997) Chronology of three physiological development phases of single-stemmed rose (*Rosa hybrida* L.) plants in response to increment in light quantum integral. Scientia Horticulturae **69:** 107-115

Bredmose N (1998) Growth, flowering, and postharvest performance of single-stemmed rose (*Rosa hybrida* L.) plants in response to light quantum integral and plant population density. Journal of the American Society for Horticultural Science **123:** 569-576

Briggs WR, Christie JM (2002) Phototropins 1 and 2 : versatile plant blue-light receptors. TRENDS in Plant Science **7:** 204-210

Brudler R, Hitomi K, Daiyasu H, Toh H, Kucho K, Ishiura M, Kanehisa M, Roberts VA, Todo T, Tainer JA, Getzoff ED (2003) Identification of a new cryptochrome class: structure, function, and evolution. Molecular Cell **11:** 59-67

Brummell D, Harpster MH, Civello PM, Palys JM, Bennett AB, Dunsmuir P (1999) Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. The Plant Cell **11:** 2203-2216

Brunel N (2001) Etude du déterminisme de la présence des bourgeons le long du rameau d'un an chez le pommier (*Malus domestica* [L.] Borkh.) : approches morphologiques, biochimiques et moléculaires. Thèse de Doctorat. Université d'Angers, Angers, 212p.

Brzobohaty B, Moore I, Kristoffersen P, Bako L, Campos N, Schell J, Palme K (1993) Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root meristem. Science **262:** 1051-1054

Buck MF, Vince-Prue D (1985) Photomodulation of stem extension in light-grown plants: evidence for two reactions. Plant and Cell Physiology **26:** 1251-1261

Büttner M (2007) The monosaccharide transporter(-like) gene family in *Arabidopsis*. FEBS Letters **581:** 2318-2324

- C -

Cabrera RI (2003) Nitrogen balance for two container-grown woody ornemental plants. Scientia Horticulturae **97:** 297-308

Caderas D, Muster M, Vogler H, Mandel T, Rose JKC, McQueen-Mason S, Kuhlemeier C (2000) Limited correlation between expansin gene expression and elongation growth rate. Plant Physiology **123:** 1399-1413

Campbell MA, Suttle JC, Sell TW (1996) Changes in cell cycle status and expression of $p34^{cdc2}$ kinase during potato tuber meristem dormancy. Physiologia Plantarum **98:** 743-752

Canamero RC, Bakrim N, Bouly JP, Garay A, Dudkin EE, Habricot Y, Ahmad M (2006) Cryptochrome photoreceptors cry1 and cry2 antagonistically regulate primary root elongation in *Arabidopsis thaliana*. Planta **224:** 995-1003

Carpita NC, Gibeaut DM (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. The Plant Journal **3:** 1-30

Casal JJ, Deregibus VA, Sanchez RA (1985) Variations in tiller dynamics and morphology in *Lolium multiflorum* Lam. vegetative and reproductive plants as affected by differences in red/far-red irradiation. Annals of Botany **56:** 553-559

Casal JJ, Sanchez RA, Deregibus VA (1986) The effect of plant density on tillering : the involvment of R/FR ratio and the proportion of radiation intercepted per plant. Environmental and Experimental Botany **26:** 365-371

Casal JJ, Smith H (1988) Persistent effects of changes in phytochrome status on internode growth in light-grown mustard: occurence, kinetics and locus of perception. Planta **175:** 214-220

Casal JJ, Sanchez RA, Botto JF (1998) Modes of action of phytochromes. Journal of Experimental Botany **49:** 127-138

Cashmore AR, Jarillo JA, Wu YJ, Liu D (1999) Cryptochromes : blue light receptors for plants and animals. Science **284:** 760-765

Catala C, Rose J, Bennett AB (2000) Auxin-regulated genes encoding cell wall-modifying proteins are expressed during early tomato fruit growth. Plant Physiology **122:** 527-534

Cataldi TRI, Margiotta G, Zambonin CG (1998) Determination of sugars and alditols in food samples by HPAEC with integrated pulsed amperometric detection using alkaline eluents containing barium or strontium ions. Food Chemistry **62:** 109-115

Catesson AM (1964) Modifications cytochimiques saisonnières des points végétatifs dans les bourgeons de l'*Acer pseudoplatanus* L. C. R. Acad. Sc. Paris **258:** 5709-5712

Cerdan PD, Chory J (2003) Regulation of flowering time by light quality. Nature **423:** 881-885

Channelière S, Rivière S, Scalliet G, Szecsi J, Jullien F, Dolle C, Vergne P, Dumas C, Bendahmane M, Hugueney P, Cock JM (2002) Analysis of gene expression in rose petals using expressed sequence tags. FEBS Letters **515:** 35-38

Chen F, Bradford K (2000) Expresion of an expansin is associated with endosperm weakening during tomato seed germination. Plant Physiology **124:** 1265-1274

Chen CT, Setter TL (2003) Response of potato tuber cell division and growth to shade and elevated CO_2. Annals of Botany **91:** 373-381

Chen M, Chory J, Fankhauser C (2004) Light signal transduction in higher plants. Annual Review of Genetics **38:** 87-117

Cheng WH, Taliercio EW, Chourey PS (1996) The miniature1 seed locus of maize encodes a cell wall invertase required for normal development of endosperm and maternal cells in the pedicel. The Plant Cell **8:** 971-983

Chincinska IA, Liesche J, Krügel U, Michalska J, Geigenberger P, Grimm B, Kühn C (2008) Sucrose transporter StSUT4 from potato affects flowering, tuberization, and shade avoidance response. Plant Physiology **146:** 515-528

Cho HT, Cosgrove DJ (2000) Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in Arabidopsis thaliana. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97:** 9783-9788

Cho HT, Cosgrove D (2004) Expansins as agents in hormone action. *In:* Plant hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action! PJ Davies ed, Dordrecht: Kluwer, pp 262-281

Choi D, Cho HT, Lee Y (2006) Expansins: expanding importance in plant growth and development. Physiologia Plantarum **126:** 511-518

Chory J, Chatterjee M, Cook RK, Elich T, Fankhauser C, Li J, Nagpal P, Neff MM, Pepper A, Poole DS, Reed JW, Vitart V (1996) From seed germination to flowering, light controls plant development via the pigment phytochrome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93:** 12066-12071

Chourey PS, Talierco EW, Carlson SJ, Ryan YL (1998) Genetic evidence that the two isozymes of sucrose synthase present in developing maize endosperm are critical, one for cell wall integrity and the other for starch biosynthesis. Molecular Genetics **259:** 88-96

Christensen AH, Quail PH (1989) Structure and expression of a maize phytochrome-encoding gene. Gene **85:** 381-390

Clapham DH, Dormling I, Ekberg I, Eriksson G, Qamarrudin M, Vince-Prue D (1998) Latitudinal cline or requirement for far-red light for the photoperiodic control of budset and extension growth in *Picea abies* (Norway spruce). Physiologia Plantarum **102:** 71-78

Clapham DH, Ekberg I, Eriksson G, Norell L, Vince-Prue D (2002) Requirement for far-red light to maintain secondary needle extension growth in nirthern but not southern populations of *Pinus sylvestris* (Scots pine). Physiologia Plantarum **114:** 207-212

Clark SE (1997) Organ formation at the vegetative shoot meristem. The Plant Cell **9:** 1067-1076

Cline MG (1994) The role of hormones in apical dominance : new approaches to an old problem in plant development. Physiologia Plantarum **90:** 230-237

Cluis CP, Mouchel CF, Hardtke CS (2004) The *Arabidopsis* transcription factor HY5 integrates light and hormone signaling pathways. The Plant Journal **38:** 332-347

Cochard H, Venisse JS, Barigah TS, Brunel N, Herbette S, Guilliot A, Tyree MT, Sakr S (2007) Putative role of aquaporins in variable hydraulic conductance of leaves in response to light. Plant Physiology **143:** 122-133

Codarin S, Gallopin G, Chasseriaux G (2006) Effect of air humidity on the growth and morphology of *Hydrangea macrophylla* L. Scientia Horticulturae **108:** 303-309

Colon-Carmona A, Chen DL, Yeh KC, Abel S (2000) Aux/IAA proteins are phosphorylated by phytochrome *in vitro*. Plant Physiology **124:** 1728-1738

Conover CA (1986) Quality. Acta Horticulturae **181:** 201-206

Cordonnier M-M, Greppin H, Pratt L-H (1986) Phytochrome from green *Avena* shoots characterised with a monoclonal antibody to phytochrome from etiolated *Pisum* shoots. Biochemistry **25:** 7657-7666

Corpet F (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucleic Acids Research **16:** 10881-10890

Cosgrove D (1993) Water uptake by growing cells : an assessment of the controlling roles of wall relaxation, solute uptake, and hydraulic conductance. International Journal of Plant Sciences **154:** 10-21

Cosgrove D, Li ZC (1993) Role of expansin in cell enlargment of oat coleoptiles. Plant Physiology **103:** 1321-1328

Cosgrove D (1997) Relaxation in a high-stress environment : the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargment. The Plant Cell **9:** 1031-1041

Cosgrove D (1998) Cell Wall Loosening by expansins. Plant Physiology **118:** 333-339

Cosgrove D (2000a) Expansine growth of plant cell walls. Plant Physiology and Biochemistry **38:** 109-124

Cosgrove D (2000b) Loosening of plant cell walls by expansins. Nature **401:** 321-326

Cosgrove D (2005) Growth of the plant cell wall. Nature Reviews Molecular Cell Biology **6:** 850-861

Cottignies A (1983) Teneur en eau et dormance dans les bourgeons de frêne. Z Pflanzenphysiol **111:** 133-139

Cottignies A (1986) The hydrolysis of starch as related to the interruption of dormancy in the ash bud. Journal of Plant Physiology **123:** 381-388

Cottignies A (1987) Dormance. Annales des Sciences Naturelles et de Botanique **8:** 93-142

Crespel L, Chirollet M, Durel CE, Zhang D, Meynet J, Gudin S (2002) Mapping of qualitative and quantitative phenotypic traits in *Rosa* using AFLP markers. Theoritical and Applied Genetic **105:** 1207-1214

Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. Plant Physiology **139:** 5-17

- D -

Darley CP, Forrester AM, McQueen-Mason S (2001) The molecular basis of plant cell wall extension. Plant Molecular Biology **47:** 179-195

de Berranger C, Christophe A, Gautier H, Varlet-Grancher C (2005) Caract.xls, un outil pour estimer les caractéristiques spectrales du rayonnement lumineux actif sur la croissance et le développement des plantes. Cahier Technique de l'I.N.R.A. **54:** 21-36

de Lucas M, Davière JM, Rodriguez-Falcon M, Pontin M, Iglesias-Pedraz JM, Lorrain S, Fankhauser C, Blazquez MA, Titarenko E, Prat S (2008) A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. Nature **451:** 480-484

Degenhardt J, Tobin EM (1996) A DNA binding activity for one of two closely defined phytochrome regulatory elements in an *Lhcb* promoter is more abundant in etiolated than in green plants. The Plant Cell **8:** 31-41

Derbyshire P, McCann MC, Roberts K (2007) Restricted cell elongation in *Arabidopsis* hypocotyls is associated with a reduced average pectin esterification level. BMC Plant Biology **7:** 1-12

Devitt ML, Stafstrom JP (1995) Cell cycle regulation during growth-dormancy cycles in pea axillary buds. Plant Molecular Biology **29:** 255-265

Devlin PF, Patel SR, Whitelam GC (1998) Phytochrome E influence internode elongation and flowering time in Arabidopsis. The Plant Cell **10:** 1479-1488

Devlin PF, Robson PRH, Patel SR, Goosey L, Sharrock RA, Whitelam GC (1999) Phytochrome D acts in the shade-avoidance syndrome in Arabidopsis by controlling elongation growth and flowering time. Plant Physiology **119:** 909-916

Devlin PF, Christie JM, Terry MJ (2007) Many hands make light work. Journal of Experimental Botany **58:** 3071-3077

Dewitte W, Murray JAH (2003) The plant cell cycle. Annual Review of Plant Biology **54:** 235-264

Doehlert DC (1987) Substrate inhibition of maize endosperm sucrose synthase by fructose and its interaction with glucose inhibition. Plant Science **52:** 153-157

Duek PD, Fankhauser C (2003) HFR1, a putative bHLH transcription factor, mediates both phytochrome A and cryptochrome signalling. The Plant Journal **34:** 827-836

Duek PD, Fankhauser C (2005) bHLH class transcription factors take centre stage in phytochrome signalling. TRENDS in Plant Science **10:** 51-54

- E & F -

Edelin C (1984) L'architecture monopodiale: l'exemple de quelques arbres d'Asie tropicale. Thèse de Doctorat. Université Montpellier II, Montpellier, 258p

Endo M, Nakamura S, Araki T, Mochizuki N, Nagatani A (2005) Phytochrome B in the mesophyll delays flowering by suppressing *FLOWERING LOCUS T* expression in Arabidopsis vascular bundles. The Plant Cell **17:** 1941-1952

Esmon CA, Tinsley AG, Ljung K, Sandberg G, Hearne LB, Liscum E (2006) A gradient of auxin and auxin-dependent transcription precedes tropic growth responses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103:** 236-241

Evers JB, Vos J, Andrieu B, Struik PC (2006) Cessation of tillering in spring wheat in relation to light interception and red:far-red ratio. Annals of Botany **97:** 649-658

Facella P, Lopez L, Carbone F, Galbraith DW, Giuliano G, Perrotta G (2008) Diurnal and circadian rhythms in the tomato transcriptome and their modulation by cryptochrome photoreceptors. PLoS ONE **3:** e2798

Fairchild CD, Schumaker MA, Quail PH (2000) HFR1 encodes an atypical bHLH protein that acts in phytochrome A signal transduction. Genes and Development **14:** 2377-2391

Fankhauser C, Yeh KC, Lagarias DM, Hong Z, Elicht D, Chory J (1999) PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in Arabidopsis. Science **284:** 1539-1541

Feraru E, Friml J (2008) PIN polar targeting. Plant Physiology **147:** 1553-1559

Ferguson BJ, Beveridge CA (2009) Roles for auxin, cytokinin, and strigolactone in regulating shoot branching. Plant Physiology **149:** 1929-1944

Ferrero F, Jacob Y, Gandelin M-H (2003) La sélection du rosier pour la fleur coupée. *In:* La rose sous serre pour la fleur coupée, INRA ed, pp 11-18

Feurtado JA, Kermode AR (2007) A merging of paths: abscisic acid and hormonal cross-talk in the control of seed dormancy maintenance and alleviation. *In:* Seed development, dormancy and germination. K Bradford, H Nonogaki eds, Annual Plant Reviews, 27. Blackwell Publishing, Oxford, pp 176-223

Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, Steber C (2008) Molecular aspects of seed dormancy. Annual Review of Plant Biology **59:** 387-415

Fleming A, Mandel T, McQueen-Mason S, Kuhlemeier C (1997) Induction of leaf primordia by the cell wall protein expansin. Science **276:** 1415-1418

Fleming A, Caderas D, Wehrli E, McQueen-Mason S, Kuhlemeier C (1999) Analysis of expansin-induced morphogenesis on the apical meristem of tomato. Planta **208:** 166-174

Fleming A (2002) The mechanism of leaf morphogenesis. Planta **216:** 17-22

Fleming A (2005) The control of leaf development. New Phytologist **166:** 9-20

Fleming AJ (2006) The co-ordination of cell division, differentiation and morphogenesis in the shoot apical meristem: a perspective. Journal of experimental Botany **57:** 25-32

Foard DE (1971) Initial protrusion of a leaf primordium can form without concurrent periclinal cell divisions. Canadian Journal of Botany **49:** 1601-1603

Folta KM, Spalding EP (2001) Unexpected roles for cryptochrome 2 and phototropin revealed by high-resolution analysis of blue light-mediated hypocotyl growth inhibition. The Plant Journal **26:** 471-478

Folta KM, Pontin M, Karlin-Neumann G, Bottini R, Spalding EP (2003) Genomic and physiological studies of early cryptochrome 1 action demonstrates roles for auxin and gibberellin in the control of hypocotyl growth by blue light. Plant Journal **36:** 203-214

Foo E, Morris SE, Parmenter K, Young N, Wang H, Jones A, Rameau C, Turnbull CGN, Beveridge CA (2007) Feedback regulation of xylem cytokinin content is conserved in pea and Arabidopsis. Plant Physiology **143:** 1418-1428

Franklin KA, Davis SJ, Stoddart WM, Vierstra RD, Whitelam GC (2003) Mutant analyses define multiple roles for phytochrome C in Arabidopsis photomorphogenesis. The Plant Cell **15:** 1981-1989

Fu H, Park WD (1995) Sink- and vascular-associated sucrose synthase functions are encoded by different gene classes in potato. Plant Cell **7:** 1369-1385

Fujioka S, Yokota T (2003) Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. Annual Review of Plant Biology **54:** 137-164

Furuya M, Schäfer E (1996) Photoperception and signalling of induction reactions by different phytochromes. TRENDS in Plant Science **1:** 301-307

Fustec J, Beaujard F (2000) Effect of photoperiod and nitrogen supply on basal shoots development in *Rhododendron catawbiense*. Biologia Plantarum **43:** 511-515

- G -

Gao Z, Maurousset L, Lemoine R, Yoo SD, van Nocker S, Loescher W (2003) Cloning, expression, and characterization of sorbitol transporters from developing sour cherry fruit and leaf sink tissues. Plant Physiology **131:** 1566-1575

Garcia-Martinez JL, Keith B, Bonner BA, Stafford AE, Rappaport L (1987) Phytochrome regulation of the response to exogenous gibberellins by epicotyls of *Vigna sinensis*. Plant Physiology **85:** 212-216

Gautier H, Varlet-Grancher C, Baudry N (1998) Comparison of horizontal spread of white clover (*Trifolium repens* L.) grown under two artificial light sources differing in their content of blue light. Annals of Botany **82:** 41-48

Gautier H, Varlet-Grancher C, Hazard L (1999) Tillering responses to the light environment and to defoliation in populations of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) selected for contrasting leaf length. Annals of Botany **83:** 423-429

Gendraud M, Pétel G (1990) Modifications in intercellular communications, cellular characteristics and change in morphogenetic potentialities of Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus* L.). *In:* Intra- and extracellular communications in plants : reception, transmission, storage and expression of messages. B Millet, H Greppin, eds, INRA, Paris, pp 170-175

Geromel C, Ferreira LP, Davrieux F, Guyot B, Ribeyre F, Brigida dos Santos Scholz M, Protasio Pereira LF, Vaast P, Pot D, Leroy T, Androcioli Filho A, Esteves Vieira LG, Mazzafera P, Marraccini P (2008) Effects of shade on the development and sugar metabolism of coffee (Coffea arabica L.) fruits. Plant Physiology and Biochemistry **46:** 569-579

Giliberto L, Perrotta G, Pallara P, Weller JL, Fraser PD, M. BP, Fiore A, Tavazza M, Giuliano G (2005) Manipulation of the blue light photoreceptor cryptochrome 2 in tomato affects vegetative development, flowering time, and fruit antioxudant content. Plant Physiology **137:** 199-208

Gilmartin PM, Sarokin L, Memelink J, Chua N-H (1990) Molecular light switches for plant genes. The Plant Cell **2:** 369-378

Girault T, Bergougnoux V, Combes D, Viémont J-D, Leduc N (2008) Light controls shoot meristem organogenic activity and leaf primordia growth during bud burst in *Rosa sp*. Plant, Cell and Environment **31:** 1534-1544

Godt DE, Roitsch T (1997) Regulation and tissue-specific distribution of mRNAs for three extracellular invertase isoenzymes of tomato suggests an important function in establishing and maintaining sink metabolism. Plant Physiology **115:** 273-282

Golovatskaya IF (2008) Effect og gibberellin on *Arabidopsis* growth, development, and hormonal balance under green and blue light. Russian Journal of Plant Physiology **55:** 315-320

Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, Puech-Pagès V, Dun EA, Pillot JP, Letisse F, Matusova R, Danoun S, Portais JC, Bouwmeester H, Bécard G, Beveridge CA, Rameau C, Rochange SF (2008) Strigolactone inhibition of shoot branching. Nature **455:** 189-194

Gonzalez MC, Roitsch T, Cejudo FJ (2005) Circadian and developmental regulation of vacuolar invertase expression in petioles of sugar beet plants. Planta **222:** 386-395

Grandjean O, Vernoux T, Laufs P, Belcram K, Mizukami Y, Traas J (2004) In vivo analysis of cell division, cell growth, and differentiation at the shoot apical meristem in Arabidopsis. The Plant Cell **16:** 74-87

Granier C, Tardieu F (1999) Leaf expansion and cell division are affected by reducing absored light before but not after the decline in cell division rate in the sunflower leaf. Plant, Cell and Environment **22:** 1365-1376

Granot D (2008) Putting plant hexokinases in their proper place. Phytochemistry **69:** 2649-2654

Gray-Mitsumune M, Blomquist K, McQueen-Mason S, Teeri TT, Sundberg B, Mellerowicz EJ (2008) Ectopic expression of a wood-abundant expansin *PttEXPA1* promotes cell expansion in primary and secondary tissues in aspen. Plant Biotechnology Journal **6:** 62-72

Gubler F, Kalla R, Roberts JK, Jacobsen J (1995) Gibberellin-regulated expression of a *myb* gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pl alpha-amylase gene promoter. The Plant Cell **7:** 1879-1891

Gubler F, Hughes T, Waterhouse P, Jacobsen J (2008) Regulation of dormancy in barley by blue light and after-ripening: effects on abscisic acid and gibberellin metabolism. Plant Physiology **147:** 886-896

Gudin S (2000) Rose: genetics and breeding. Plant Breeding Reviews **17:** 159-189

Gyula P, Schafer E, Nagy F (2003) Light perception and signalling in higher plants. Current Opinion in Plant Biology **6:** 446-452

- H -

Halle F, Oldeman RAA (1970) Essai sur l'architecture et la dynamique de croissance des arbres tropicaux, Ed Masson, Ed. Monog. Bot. et Biol. Vég., 178p

Hansen P (1970) ^{14}C-studies on apple trees. V. Translocation of labelled compounds from leaves to fruits and their conversion within the fruit. Physiologia Plantarum **23:** 564-573

Harrison EP, McQueen-Mason S, Manning K (2001) Expression of six expansin genes in relation to extension activity in developing strawberry fruit. Journal of Experimental Botany **52:** 1437-1446

Hauser BA, Cordonnier-Pratt MM, Daniel-Vedele F, Pratt LH (1995) The phytochrome gene family in tomato includes a novel subfamily. Plant Molecular Biology **29:** 1143-1155

Hay A, Kaur H, Phillips A, Hedden P, Hake S, Tsiantis M (2002) The gibberellin pathway mediates KNOTTED1-type homeobox function in plants with different body plans. Current Biology **12:** 1557-1565

Hayama H, Ito A, Moriguchi T, Kashimura Y (2003) Identification of a new expansin gene closely associated with peach fruit softening. Postharvest Biology and Technology **29:** 1-10

Healy WH, Wilkins HF (1980) The effect of light quality on 'bottom-breaks' in roses. Roses Inc. Bulletin **November:** 71-72

Heide OM (1993) Daylength and thermal time responses of budburst during dormancy release in some northern deciduous trees. Physiologia Plantarum **88:** 531-540

Helmerhorst E, Stockes GR (1980) Microcentrifuge desalting in rapid quantitative method for desalting small amounts of proteins. Analytical Biochemistry **104:** 130-135

Hennig L, Büche C, Eichenberg K, Schafer E (1999a) Dynamic properties of endogenous phytochrome A in Arabidopsis seedlings. Plant Physiology **121:** 571-578

Hennig L, Funk M, Whitelam GC, Schafer E (1999b) Functional interaction of cryptochrome 1 and phytochrome D. Plant Journal **20:** 289-294

Hirschfeld M, Tepperman JM, Clack T, Quail PH, Sharrock RA (1998) Coordination of phytochrome levels in *phyB* mutants of Arabidopsis as revealed by apoprotein-specific monoclonal antibodies. Genetics **149:** 523-535

Hisada A, Hanzawa H, Weller JL, Nagatani A, Reid JB, Furuya M (2000) Light-induced nuclear translocation of endogenous pea phytochrome A visualized by immunocytochemical procedures. The Plant Cell **12:** 1063-1078

Hiwasa K, Rose J, Nakano R, Inaba A, Kubo Y (2003) Differential expression of seven α-expansin genes during growth and ripening of pear fruit. Physiologia Plantarum **117:** 564-572

Holm M, Ma LG, Qu LJ, Deng X-W (2002) Two interactions bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in *Arabidopsis*. Genes and Development **16:** 1247-1259

Hopkins WG (2003) Physiologie végétale. De Boeck ed, 514p

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

Howe GT, Bucciaglia PA, Hackett WP, Furnier GR, Cordonnier-Pratt MM, Gardner G (1998) Evidence that the phytochrome gene family in black cottonwood has one PHYA locus and two PHYB loci but lacks members of the PHYC/F and PHYE subfamilies. Molecular Biology and Evolution **15:** 160-175

Huala E, Oeller PW, Liscum E, Han IS, Larsen E, Briggs WR (1997) *Arabidopsis* NPH1 : a protein kianse with a putative redox-sensing domain. Science **278:** 2120-2123

Huang J-W, Chen J-T, Yu W-P, Shyur L-F, Wang A-Y, Sung H-Y, Lee P-D, Su J-C (1996) Complete structures of three rice sucrose synthase isogenes and differential regulation of their expressions. Bioscience Biotechnology and Biochemistry **60:** 233-239

Hudson ME, Quail PH (2003) Identification of promoter motifs involved in the network of phytochrome A-regulated gene expression by combined analysis of genomic sequence and microarray data. Plant Physiology **133:** 1605-1616

Humphrey TV, Bonetta DT, Goring DR (2007) Sentinels at the wall: cell wall receptors and sensors. New Phytologist **176:** 7-21

- I & J -

Iida M, Bantog N, Yamada K, Shiratake K, Yamaki S (2004) Sorbitol- and other sugar-induced expression of the NAD^+-dependent sorbitol dehydrogenase gene in Japanese pear fruit. Journal of the American Society for Horticultural Science **129:** 870-875

Imaizumi T, Tran HG, Swartz TE, Briggs WR, Kay SA (2003) FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in *Arabidopsis*. Nature **426:** 302-306

Inada S, Ohgishi M, Mayama T, Okada K, Sakai T (2004) RPT2 is a signal transducer involved in phototrophic response and stomatal opening by association with phototropin 1 in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Cell **16:** 887-896

Ishikawa S, Maekawa M, Arite T, Onishi K, Takamure I, Kyozuka J (2005) Suppression of tiller bud activity in tillering dwarf mutants of rice. Plant and Cell Physiology **46:** 79-86

Ito A, Hayama H, Kashimura Y (2005) Partial cloning and expression analysis of genes encoding NAD+-dependent sorbitol dehydrogenase in pear bud during flower bud formation. Scientia Horticulturae **103:** 413-420

Jarillo JA, Capel J, Tang RH, Yang HQ, Alonso JM, Ecker JR, Cashmore AR (2001) An Arabidopsis circadian clock component interacts with both CRY1 and phyB. Nature **410:** 487-490

Jiao Y, Lau OS, Deng X-W (2007) Light-regulated transcriptional networks in higher plants. Nature Reviews Genetics **8:** 217-230

Johansson H, Sterky F, Amini B, Lundeberg J, Kleczkowski LA (2002) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding poplar UDP-glucose dehydrogenase, a key gene of hemicellulose/pectin formation. Biochimica et Biophysica Acta **1576:** 53-58

Johnsen O, Fossdal CG, Baumann R, Molmann JM, Daehlen OG, Clapham DH, Skoppa T (2003) The maternal temperature during zygotic embryogenesis influences the adaptative properties of norway spruce progeneis : a gene? Tree Biotechnology **S3.7**

Josse EM, Foreman J, Halliday KJ (2008) Paths through the phytochrome network. Plant, Cell and Environment **31:** 667-678

- K -

Kagawa T, Sakai T, Suetsugu N, Oikawa K, Ishiguro S, Kato T, Tabata S, Okada K, Wada M (2001) *Arabidopsis* NPL1 : a phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response. Science **291:** 2138-2141

Kanayama Y, Granot D, Nir D, Petreikov M, Schaffer A, Powell A, Bennett AB (1998) Tomato fructokinases exhibit differential expression and substrate regulation. Plant Physiology **117:** 85-90

Kaneko M, Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Matsuoka M (2002) The alpha-amylase induction in endosperm during rice seed germination is caused by gibberellin synthesized in epithelium. Plant Physiology **128:** 1264-1270

Kang B, Grancher N, Koyffmann V, Lardemer D, Burney S, Ahmad M (2008) Multiple interactions between cryptochrome and phototropin blue-light signalling pathways in *Arabidopsis thaliana*. Planta **227:** 1091-1099

Kawamura K, Takeda H (2002) Light environment and crown architecture of two temperate *Vaccinium* species: inherent growth rules versus degree of plasticity in light response. Canadian Journal of Botany **80:** 1063-1077

Kawamura K, Takeda H (2004) Rules of crown development in the clonal shrub *Vaccinium hirtum* in a low-light understory: a quantitative analysis or architecture. Canadian Journal of Botany **82:** 329-339

Kebrom TH, Burson BL, Finlayson SA (2006) Phytochrome B represses *Teosinte Branched1* expression and induces sorghum axillary bud outgrowth in response to light signals. Plant Physiology **140:** 1109-1117

Kehoe DM, Grossmann AR (1996) Similarity of a chromatic adaptation sensor to phytochrome and ethylene receptors. Science **273:** 1409-1412

Kendrick RE, Kronenberg GHM (1994) Photomorphogenesis in plants. Kluwer, Dordrecht, Pays-Bas, 828p

Khanna R, Huq E, Kikis EA, Al-Sady B, Lanzatella C, Quail PH (2004) A novel molecular recognition motif necessary for targeting photoactivated phytochrome signaling to specific basic helix-loop-helix transcription factors. Plant Cell **16:** 3033-3044

Khayat E, Zieslin N (1982) Environmental factors involved in the regulation of sprouting of basal buds in rose plants. Journal of Experimental Botany **33:** 1286-1292

Khayat E, Zieslin N (1989) Translocation of 14C carbohydrate content and activity of the enzymes of sucrose metabolism in rose petals at different night temperature. Physiologia Plantarum **76:** 581-585

Kim W, Lee J (2002) Evaluation of photosynthate accumulation and distribution and radiation use efficiency in roses in relation to irradiance and night temperature. Acta Horticulturae**:** 129-136

Kim Y-C, Nakajima M, Nakayama A, Yamaguchi I (2005) Contribution of gibberellins to the formation of *Arabidopsis* seed coat through starch degradation. Plant and Cell Physiology **46:** 1317-1325

Kingston-Smith AH, Galtier N, Pollock CJ, HFoyer CH (1998) Soluble acid invertase activity in leaves is independent of species differences in leaf carbohydrates, diurnal sugar profiles and paths of phloem loading. New Phytologist **139:** 283-292

Kinoshita T, Doi M, Suetsugu N, Kagawa T, Wada M, Shimazaki K (2001) Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. Nature **414:** 656-660

Kleine T, Lockhart P, Batschauer A (2003) An *Arabidopsis* protein closely related to *Synechocystis* cryptochrome is targeted to organelles. The Plant Journal **35:** 93-103

Kleine T, Kindgren P, Benedict C, Hendrickson L, Strand A (2007) Genome-wide gene expression analysis reveals a critical role for CRYPTOCHROME1 in the response of Arabidopsis to high irradiance. Plant Physiology **144:** 1391-1406

Koch KE (2004) Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. Current Opinion in Plant Biology **7:** 235-246

Koussa T, Cholet C, Cherrad M (2001) Effects of grapevine latents buds (*Vitis vinifera* L., cv Merlot) chilling on their stach content : biochemical and cytological approaches. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin **35:** 207-214

Kozuka T, Horiguchi G, Kim GT, Ohgishi M, Sakai T, Tsukaya H (2005) The different growth responses of the *Arabidopsis thaliana* leaf blade and the petiole during shade avoidance are regulated by photoreceptors and sugar. Plant and Cell Physiology **46:** 213-223

Kumar N, Srivastava GC, Dixit K, Mahajan A, Pal M (2007) Role of carbohydrates in flower bud opening in rose (Rosa hybrida L.). Journal of Horticultural Science & Biotechnology **82:** 235-242

Kumar N, Srivastava GC, Dixit K (2008) Flower bud opening and senescence in roses (*Rosa hybrida* L.). Plant Growth Regulation **55:** 81-99

Kuo TM, Doehlert DC, Crawford CG (1990) Sugar metabolism in germinating soybean seeds. Evidence for the sorbitol pathway in soybean axes. Plant Physiology **93:** 1514-1520

- L -

Lagarias DM, Wu SH, Lagarias JC (1995) Atypical phytochrome gene structure in the green alga *Mesotaenium caldariorum*. Plant Molecular Biology **29:** 1127-1142

Lam E, Chua N-H (1989) ASF-2: a factor that binds to the cauliflower mosaic virus 35S promoter and a conserved GATA motif in *Cab* promoters. The Plant Cell **1:** 1147-1156

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

Lariguet P, Schepend I, Hodgson D, Pedmale UV, Trevisan M, Kami C, de Carbonnel M, Alonso JM, Ecker JR, Liscum E, Fankhauser C (2006) PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 1 is a phototropin 1 binding protein required for phototropism. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103:** 10134-10139

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) ClustalW and ClustalX version 2. Bioinformatics **23:** 2947-2948

Laserna MP, Sanchez RA, Botto JF (2008) Light-related loci controlling seed germination in L*er* x Cvi and Bay-0 x Sha recombinant inbred-line populations of *Arabidopsis thaliana*. Annals of Botany **102:** 631-642

Le Gourrierec J, Li YF, Zhou DX (1999) Transcriptional activation by *Arabidopsis* GT-1 may be through interaction with TFIIA-TBP-TATA complex. The Plant Journal **18:** 663-668

Le Hir R (2005) Développement hétéroblastique et croissance rythmique chez le chêne pédonculé (*Quercus robur* L.) : étude de l'implication du métabolisme glucidique et de régulateurs de croissance. Thèse de Doctorat. Université d'Angers, Angers, 197p

Le Hir R, Pelleschi-Travier S, Viémont JD, Leduc N (2005) Sucrose synthase expression pattern in the rhytmically growing shoot of common oak (*Quercus robur* L.). Annals of Forest Science **62:** 585-591

Le Hir R, Leduc N, Jeannette E, Viemont J-D, Pelleschi Travier S (2006) Variations in sucrose and ABA concentrations are concomitant with heteroblastic leaf shape changes in a rhythmically growing species (*Quercus robur* L.). Tree physiology **26:** 229-238

Lecharny A, Jacques R (1980) Light inhibition of internode elongation in green plants. Planta **149:** 384-388

Lee Y, Kende H (2001) Expression of β-expansins is correlated with internodal elongation in deepwater rice. Plant Physiology **127:** 645-654

Lee Y, Choi D (2005) Biochemical properties and localization of the β-expansin OsEXPB3 in rice (*Oryza sativa* L.). Molecular Cell **20:** 119-126

Lee J, He K, Stolc V, Lee H, Figueroa P, Gao Y, Tongprasit W, Zhao H, Lee I, Deng X-W (2007) Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development. The Plant Cell **19:** 731-749

Lefebvre V, North H, Frey A, Sotta B, Seo M, Okamoto M, Nambara E, Marion-Poll A (2006) Functional analysis of Arabidopsis *NCED6* and *NCED9* genes indicates that ABA synthesized in the endosperm is involved in the induction of seed dormancy. Plant Journal **45:** 309-319

Li ZC, Durachko DM, Cosgrove D (1993) An oat coleoptile wall protein that induces wall extension in vitro and that is antigenically related to a similar protein from cucumer hypocotyls. Planta **191:** 349-356

Li Y, Jones L, McQueen-Mason S (2003) Expansins and cell growth. Current Opinion in Plant Biology **6:** 603-610

Li Q-H, Yang H-Q (2007) Cryptochrome signaling in plants. Photochemistry and Photobiology **83:** 94-101

Liguori-Loiseau M (1991) La qualité des plantes en pots: influence du substrat et du régime d'irrigation. Thèse de Doctorat. Université d'Angers, Angers, 199p

Lin C, Robertson DE, Ahmad M, Raibekas AA, Jorns MS, Dutton PL, Cashmore AR (1995) Association of flavin adenine dinucleotide with the Arabidopsis blue light receptor CRY1. Science **269:** 968-970

Lin C, Ahmad M, Cashmore AR (1996) Arabidopsis cryptochrome 1 is a soluble protein mediating blue light-dependent regulation of plant growth and development. The Plant Journal **10:** 893-902

Lin C (2002) Blue light receptors and signal transduction. The Plant Cell**:** S207-S225

Lin C, Shalitin D (2003) Cryptochrome structure and signal transduction. Annual Review of Plant Biology **54:** 469-496

Lin Z, Ni Z, Zhang Y, Yao Y, Wu H, Sun Q (2005) Isolation and characterization of 18 genes encoding α- and β-expansins in wheat (*Triticum aestivum* L.). Molecular Genetics and Genomics **274:** 548-556

Lin C, Todo T (2005) The cryptochromes. Genome Biology **6:** 220

Liscum E, Briggs WR (1995) Mutations of Arabidopsis in potential transduction and response components of the phototrophic signaling pathway. Plant Physiology **112:** 291-296

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Methods **25:** 402-408

Ljung K, Bhalerao RP, Sandberg G (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. The Plant Journal **28:** 465-474

Lo Bianco R, Rieger M, Sung SS (1998) A simple, rapid extraction and assay procedure for NAD^+-dependent sorbitol dehydrogenase (SDH) in peach. Journal of the American Society for Horticultural Science **123:** 1065-1068

Lo Bianco R, Rieger M, Sung SS (1999a) Activities of sucrose and sorbitol metabolizing enzymes in vegetative sinks of peach and correlation with sink growth rate. Journal of the American Society for Horticultural Science **124:** 381-388

Lo Bianco R, Rieger M, Sung SS (1999b) Carbohydrate metabolism of vegetative and reproductive sinks in the late-maturing peach cultivar 'Encore'. Tree Physiology **19:** 103-109

Lo Bianco R, Rieger M, Sung SJS (2000) Effect of drought on sorbitol and sucrose metabolism in sinks and sources of peach. Physiologia Plantarum **108:** 71-78

Loescher W (1987) Physiology and metabolism of sugar alcohols in higher plants. Physiologia Plantarum **70:** 553-557

Lopez-Juez E, Kobayashi M, Sakurai A, Kamiya Y, Kendrick RE (1995) Phytochrome, gibberellins, and hypocotyl growth (a study using the cucumber (*Cucumis sativus* L.) long hypocotyl mutant). Plant Physiology **107:** 131-140

Lopez-Juez E, Dillon E, Magyar Z, Khan S, Hazeldine S, de Jager SM, Murray JAH, Beemster GTS, Bögre L, Shanahan H (2008) Distinct light-initiated gene expression and cell cycle programs in the shoot apex and cotyledons of *Arabidopsis*. The Plant Cell **20:** 947-968

Lu CA, Lim EK, Yu SM (1998) Sugar response sequence in the promoter of a rice α-amylase gene serves as a transcriptional enhancer. Journal of Biological Chemistry **273:** 10120-10131

Lu Y, Sharkey TD (2006) The importance of maltose in transitory starch breakdown. Plant, Cell and Environment **29:** 353-366

- M -

Ma L, Li J, Qu LJ, Hager J, Chen Z, Zhao H, Deng X-W (2001) Light control of *Arabidopsis* development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. Plant Cell **13:** 2589-2607

Ma L, Sun N, Liu X, Jiao Y, Zhao H, Deng X-W (2005) Organ-specific expression of *Arabidopsis* genome during development. Plant Physiology **138:** 80-91

Maas FM, Bakx EJ (1995) Effects of light on growth and flowering of *Rosa hybrida* 'Mercedes'. Plant Physiology and Biochemistry **120:** 571-576

Maia N, Vénard P (1976) Cytotaxonomie du genre *Rosa* et origine des rosiers cultivés. *In:* Travaux sur le rosier de serre. FNHP ed, INRA Editions, Paris, pp 7-20

Mao J, Zhang YC, Sang Y, Li QH, Yang HQ (2005) A role for *Arabidopsis* cryptochromes and COP1 in the regulation of stomatal opening. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102:** 12270-12275

Marana C, Garcia-Olmedo F, Pilar C (1990) Differential expression of two types of sucrose synthase-encoding genes in wheat in response to anaerobiosis, cold shock and light. Gene **88:** 167-172

Marga F, Grandbois M, Cosgrove D, Baskin TI (2005) Cell wall extension results in the coordinate separation of parallel microfibrils : evidence from scanning electron microscopy and atomic force microscopy. The Plant Journal **43:** 181-190

Marks TR, Simpson SE (1999) Effect of irradiance on shoot development *in vitro*. Plant Growth Regulation **28:** 133-142

Marquat C, Pétel G, Gendraud M (1997) Saccharose and sorbitol transporters from plasmalemma membrane vesicles of peach tree leaves. Biologia Plantarum **39:** 369-378

Marquat C, Vandamme M, Gendraud M, Pétel G (1999) Dormancy in vegetative buds of peach: relation between carbohydrate absorption potentials and carbohydrate concentration in the bud during dormancy and its release. Scientia Horticulturae **79:** 151-162

Martin M, Piola F, Chessel D, Jay M, Heizmann P (2001) The domestication process of the modern rose : genetic structure and allelic composition of the rose complex. Theoritical and Applied Genetic **102:** 398-404

Martinez-Garcia J, Garcia-Martinez JL (1992) Interaction of gibberellins and phytochrome in the control of cowpea epicotyl elongation. Physiologia Plantarum **86:** 236-244

Martinez-Garcia J, Huq E, Quail PH (2000) Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. Science **288:** 859-863

Mathews S, Sharrock RA (1996) The phytochrome gene family in grasses (Poaceae) : a phylogeny and evidence that grasses have a subset of the loci found in dicot angiosperms. Molecular Biology and Evolution **13:** 1141-1150

Mathews S (2006) Phytochrome-mediated development in land plants: red light sensing evolves to meet the challenges of changing light environments. Molecular Ecology **15:** 3483-3503

Matsukura C, Saitoh T, Hirose T, Ohsugi R, Perata P, Yamaguchi J (2000) Sugar uptake and transport in rice embryo. Expression of companon cell-specific sucrose transporter (*OsSUT1*) induced by sugar and light. Plant Physiology **124:** 85-93

Matsumoto N, Hirano T, Iwasaki T, Yamamoto N (2003) Functional analysis and intracellular localization of rice cryptochromes. Plant Physiology **133:** 1494-1503

Maurel K (2003) Métabolisme des glucides dans le bourgeon végétatif de pêcher (*Prunus persica* L. Batsch) en relation avec la dormance. Thèse de Doctorat. Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, 245p

Maurel K, Berenhauser Leite G, Bonhomme M, Guilliot A, Rageau R, Pétel G, Sakr S (2004a) Trophic control of bud break in peach (*Prunus persica*) trees : a possible role of hexoses. Tree Physiology **24:** 579-588

Maurel K, Sakr S, Gerbe F, Guilliot A, Bonhomme M, Rageau R, Pétel G (2004b) Sorbitol uptake is regulated by glucose through the hexokinase pathway in vegetative peach-tree buds. Journal of Experimental Botany **55:** 879-888

Maurel C, Verdoucq L, Luu DT, Santoni V (2008) Plant aquaporins : membrane channels with multiple integrated functions. Annual Review of Plant Biology **59:** 595-624

McIntyre GI (1987) The role of water in the regulation of plant development. Canadian Journal of Botany **65:** 1287-1298

McQueen-Mason S, Durachko DM, Cosgrove D (1992) Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. The Plant Cell **4:** 1425-1433

McQueen-Mason S, Fry SC, Durachko DM, Cosgrove D (1993) The relationship between xyloglucan endotransglycosylase and in vitro cell wall extension in cucumber hypocotyls. Planta **190:** 327-331

McQueen-Mason S, Cosgrove D (1994) Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91:** 6574-6578

McQueen-Mason S, Cosgrove D (1995) Expansin mode of action on cell walls. Analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding. Plant Physiology **107:** 87-100

McSteen P, Leyser O (2005) Shoot branching. Annual Review of Plant Biology **56:** 353-374

Mella RA, Burgin MJ, Sanchez RA (2004) Expansin gene expression in *Datura ferox* L. seeds is regulated by the low-fluence response, but not by the high-irradiance response, of phytochromes. Seed Science Research **14:** 61-71

Millard P, Proe MF (1991) Nitrogen uptake, partitioning and internal cycling in *Picea sitchensis* (Bong.) Carr. As influenced by nitrogen supply. New Phytologist **125:** 113-119

Miyamoto K, Ito E, Yamamoto H, Ueda J, LKamisaka S (2000) Gibberellin-enhanced growth and sugar accumulation in growing subhooks of etiolated *Pisum sativum* seedlings: effects of actinomycin D on invertase activity, soluble sugars and stem elongation. Journal of Plant Physiology **156:** 449-453

Mohr H, Shropshire W (1983) An introduction to photomorphogenesis. *In* W Shropshire, H Mohr, eds, Photomorphogenesis. Encyclopedia of plant physiology. Springer-Verlag, Berlin, pp 24-28

Moing A, Carbonne F, Rashad MH, Gaudillère JP (1992) Carbon fluxes in mature peach leaves. Plant Physiology **100:** 1878-1884

Molmann JM, Juntilla O, Johnsen JE, Polsen JE (2006) Effects of red, far-red and blue light in maintaining growth in latitudinal populations of Norway spruce (*Picea abies*). Plant, Cell and Environment **29:** 166-172

Monet R (1983) Le pêcher, génétique et physiologie. INRA et Masson ed, Paris, 133p

Monte E, Alonso JM, Ecker JR, Zhang Y, Li X, Young J, Austin-Phillips S, Quail PH (2003) Isolation and characterization of *phyC* mutants in Arabidopsis reveals complex crosstalk between phytochrome signaling pathways. The Plant Cell **15:** 1962-1980

Monte E, Al-Sady B, Leivar P, Quail PH (2007) Out of the dark: how the PIFs are unmasking a dual temporal mechanism of phytochrome signalling. Journal of Experimental Botany **58:** 3125-3133

Mor Y, Halevy AH, Porath D (1980) Characterization of the light reaction in promoting the mobilizing ability of rose shoot tips. Plant Physiology **66:** 996-1000

Mor Y, Halevy AH (1980) Promotion of sink activity of developing rose shoot by light. Plant Physiology **66:** 990-995

Mor Y, Halevy AH (1984) Dual effect of light on flowering sprouting of rose shoots. Physiologia Plantarum **61:** 119-124

Morais de Sousa S, del Giudice Paniago M, Arruda P, Yunes JA (2008) Sugar levels modulate *sorbitol dehydrogenase* expression in maize. Plant Molecular Biology **68:** 203-213

Morandi B, Grappedelli LC, Rieger M, Lo Bianco R (2008) Carbohydrate availability affects growth and metabolism in peach fruit. Physiologia Plantarum **133:** 229-241

Morel P, Galopin G, Donès N (2009) Using architectural analysis to compare the shape of two hybrid tea rose genotypes. Scientia Horticulturae **120:** 391-398

Morgan DC, O'brien T, Smith H (1980) Rapid photo-modulation of stem extension in light grown *Sinapis alba* L. Studies on kinetics, site of perception and photo-receptor. Planta **150:** 95-101

Motchoulski A, Liscum E (1999) *Arabidopsis* NPH3 : a NPH1 photoreceptor-interacting protein essential for phototropism. Science **286:** 961-964

Muleo R, Morini S, Casano S (2001) Photoregulation of growth and branching of plum shoots : physiological action of two photosystems. In vitro Cellular and Development Biology **37:** 609-617

Muleo R, Morini S (2006) Light quality regulates shoot cluster growth and development of MM106 apple genotype in in vitro culture. Scientia Horticulturae **108:** 364-370

Muleo R, Morini S (2008) Physiological dissection of blue and red light regulation of apical dominance and branching in M9 apple rootxtock growing in vitro. Journal of Plant Physiology **165:** 1838-1846

Murayama S, Handa H (2007) Genes for alkaline/neutral invertase in rice : alkaline/neutral invertases are located in plant mitochondria and also in plastids. Planta **225:** 1193-1203

Murray MB, Cannell MGR, Smith RI (1989) Date of budburst of fifteen tree species in Britain following climatic warming. Journal of Applied Ecology **26:** 693-700

- N -

Nagashima A, Suzuki G, Uehara Y, Saji K, Furukawa T, Koshiba T, Sekimoto M, Fujioka S, Kuroha T, Kojima M, Sakakibara H, Fujisawa N, Okada K, Sakai T (2008) Phytochromes and cryptochromes regulate the differential growth of Arabidopsis hypocotyls in both a PGP19-dependent and a PGP19-independent manner. The Plant Journal **53:** 516-529

Nagatani A, Reed JW, Chory J (1993) Isolation and initial characterization of Arabidopsis mutants that are deficient in phytochrome A. Plant Physiology **102:** 269-277

Nagatani A (2004) Light-regulated nuclear localization of phytochromes. Current Opinion in Plant Biology **7:** 708-711

Nagy F, Schafer E (2002) Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants. Annual Review of Plant Biology **53:** 329-355

Naito T, Kiba T, Koizumi N, Yamashino T, Mizuno T (2007) Characterization of a unique GATA family gene that responds to both light and cytokinin in *Arabidopsis thaliana*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry **71:** 1557-1560

Napoli CA (1996) Highly branched phenotype of the petunia dad1-1 mutant is reversed by grafting. Plant Physiology **111:** 27-37

Nardini A, Salleo S, Andri S (2005) Circadian regulation of leaf hydraulic conductance in sunflower (*Helianthus annuus* L. cv Margot). Plant, Cell and Environment **28:** 750-759

Neff MN, Chory J (1998) Genetic interactions between phytochrome A, phytochrome B, and cryptochrome 1 during Arabidopsis development. Plant Physiology **118:** 27-36

Neff MN, Fankhauser C, Chory J (2000) Light : an indicator of time and place. Genes and Development **14:** 257-271

Negm FB, Loescher W (1979) Detection and characterization of sorbitol dehydrogenase from apple callus tissue. Plant Physiology **64:** 69-73

Negm FB, Loescher W (1981) Characterization and partial purification of aldose-6-phosphate reductase (alditol-6-phosphate : NADP 1-oxidoreductase) from apple leaves. Plant Physiology **67:** 139-142

Ni M, Tepperman JM, Quail PH (1998) PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. Cell **95:** 657-667

Ni M, Tepperman JM, Quail PH (1999) Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light. Nature **400:** 781-784

Niinemets Ü, Kull O, Tenhunen J-D (1998) An analysis of lights effects on foliar morphology, physiology, and light interception in temperate deciduous woody species of contrasting shade tolerance. Tree physiology **18:** 681-696

Niinemets U, Lukjanova A (2003) Total foliar area and average leaf age may be more strongly associated with brarnching frequency than with leaf longevity in temperate conifers. New Phytologist **158:** 75-89

Nordström A, Tarkowski P, Tarkowska D, Norbaek R, Astot C, Dolezal K, Sandberg G (2004) Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101:** 8039-8044

- O & P -

Oh E, Yamaguchi S, Kamiya Y, Bae G, Chung WI, Choi G (2006) Light activates the degradation of PIL5 protein to promote seed germination through gibberellin in Arabidopsis. Plant Journal **47:** 124-139

Oh E, Yamaguchi S, Hu J, Yusuke J, Jung B, Paik I, Lee H-S, Sun T-P, Kamiya Y, Choi G (2007) PIL5, a phytochrome-interacting bHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by binding directly to the *GA1* and *RGA* promoters in *Arabidopsis* seeds. Plant Cell **19:** 1191-1208

Ohgishi M, Saji K, Okada K, Sakai T (2004) Functional analysis of each blue light receptor, cry1, cry2, phot1 and phot2, by using combinatorial multiple mutants in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101:** 2223-2228

Ohta K, Moriguchi R, Kanahama K, Yamaki S, Kanayama Y (2005) Molecular evidence of sorbitol dehydrogenase in tomato, a non-Rosaceae plant. Phytochemistry **66:** 2822-2828

Oldeman RAA (1974) L'architecture de la forêt guyanaise. Thèse de Doctorat. C.N.R.S. 7787, Montpellier, 204p

Ollier C (1993) Etude de l'influence de l'état hydrique sur la reprise de croissance du système axe-bourgeon chez le noyer. Diplôme d'Etudes Approfondies. Université de Clermont-Ferrand, 27p

Ongaro V, Leyser O (2008) Hormonal control of shoot branching. Journal of Experimental Botany **59:** 67-74

Oniflhor - TNS Sofrès (2004) Le marché de la rose coupée en 2004, 10p (http://www.oniflhor.fr/)

Osterlund MT, Hardtke CS, Wei N, Deng X-W (2000) Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. Nature **405:** 462-466

Oura Y, Yamada K, Shiratake K, Yamaki S (2000) Purification and characterization of a NAD^+-dependent sorbitol dehydrogenase from Japanese pear fruit. Phytochemistry **54:** 567-572

Oyama T, Shimura Y, Okada K (1997) The *Arabidopsis HY5* gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. Genes and Development **11:** 2983-2995

Page RD (1996) TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applications in the Biosciences **12:** 357-358

Park SW, Song KJ, Kim MY, Hwang JH, Shin YU, Kim WC, Chung WI (2002) Molecular cloning and characterization of four cDNAs encoding the isoforms of NAD-dependent sorbitol dehydrogenase from the Fuji apple. Plant Science **162:** 513-519

Parmentier C (1993) Etude physiologique et biochimique de la croissance rythmique endogène du chêne pédonculé. Recherche de son déterminisme. Thèse de Doctorat. Université de Nancy I, Nancy, 88p

Partch CL, Sancar A (2005) Photochemistry and photobiology of cryptochrome blue-light photopigments : the search for a photocycle. Photochemistry and Photobiology **81:** 1291-1304

Passardi F, Penel C, Dunand C (2004) Performing the paradoxical : how plant peroxidases modify the cell wall. TRENDS in Plant Science **9:** 534-540

Pelleschi S, Rocher JP, Prioul JL (1997) Effect of water restriction on carbohydrate metabolism and photosynthesis in mature maize leaves. Plant, Cell and Environment **20:** 493-503

Penfield S, Josse EM, Kannangara R, Gilday AD, Halliday KJ, Graham IA (2005) Cold and light control seed germination through the bHLH transcription factor SPATULA. Current Biology **15:** 1998-2006

Penfield S (2008) Temperature perception and signal transduction in plants. New Phytologist **179:** 615-628

Perrotta G, Ninu L, Flamma F, Weller JL, Kendrick RE, Nebuloso E, Giuliano G (2000) Tomato contains homologues of Arabidopsis cryptochromes 1 and 2. Plant Molecular Biology **42:** 765-773

Piechulla B, Merforth N, Rudolph B (1998) Identification of tomato *Lhc* promoter regions necessary for circadian expression. Plant Mol Biol **38:** 655-662

Pien S, Wyrzykowska J, McQueen-Mason S, Smart C, Fleming A (2001) Local expression of expansin induces the entire process of leaf development and modifies leaf shape. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98:** 11812-11117

Pilling E, Höfte H (2003) Feedback from the wall. Current Opinion in Plant Biology **6:** 611-616

Platten JD, Foo E, Elliott RC, Hecht V, Reid JB, Weller JL (2005) Cryptochrome 1 contributes to blue-light sensing in pea. Plant Physiology **139:** 1472-1482

Pommerrenig B, Papini-Terzi FS, Sauer N (2007) Differential regulation of sorbitol and sucrose loading into the phloem of *Plantago major* in response to salt stress. Plant Physiology **144:** 1029-1038

Prasad TK, Li X, Abdel-Rahman AM, Hosokawa Z, Cloud NP, La Motte CE, Cline MG (1993) Does auxin play a role in the release of apical dominance by shoot inversion in *Ipomea nil* ? Annals of Botany **71:** 223-229

Promojardin (2007) Le marché français du jardin : les chiffres 2007, 2p (http://www.promojardin.com/)

- Q & R -

Quail PH (1998) The phytochrome family : dissection of functional roles and signalling pathways among family members. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **353:** 1399-1403

Quail PH (2002) Phytochrome photosensory signalling networks. Nature Reviews Molecular Cell Biology **3:** 85-93

Rajapakse S, Byrne DH, Zhang L, Anderson N, Arumuganathan K, Ballard RE (2001) Two genetic linkage maps of tetraploid roses. Theoritical and Applied Genetic **103:** 575-583

Rayle DL, Cleland RE (1992) The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. Plant Physiology **99:** 1271-1274

Reed JW, Nagpal P, Poole DS, Furuya M, Chory J (1993) Mutations in the gene for red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout *Arabidopsis* development. The Plant Cell **5:** 147-157

Refrégier G, Pelletier S, Jaillard D, Höfte H (2004) Interaction between wall deposition and cell elongation in dark-grown hypocotyl cells in Arabidopsis. Plant Physiology **135:** 959-968

Rehder A (1947) A manual of cultivated trees and shrubs hardy in North America exclusive of the subtropical and warmer temperate regions, Ed 2nd ed. Macmillan, New York, USA

Reidy B, McQueen-Mason S, Nösberger J, Fleming A (2001) Differential expression of α- and β-expansin genes in the elongating leaf of *Festuca pratensis*. Plant Mol Biol **46:** 491-504

Reinhardt D, Wittwer F, Mandel T, Kuhlemeier C (1998) Localized upregulation of a new expansin gene predicts the site of leaf formation in the tomato meristem. Plant Cell **10:** 1427-1437

Reinhardt D, Mandel T, Kuhlemeier C (2000) Auxin regulated the initiation and radial position of plants lateral organs. Plant Cell **12:** 507-518

Reyes JC, Muro-Pastor MI, Florencio FJ (2004) The GATA family of transcription factors in Arabidopsis and rice. Plant Physiology **134:** 1718-1732

Rinne P, Tuominen H, Juntilla O (1994) Seasonal changes in bud dormancy in relation to bud morphology, water and starch content, and abscisic acid concentration in adult trees of *Betula pubescens*. Tree Physiology **14:** 549-561

Robin C, Hay MJM, Newton PCD, Greer DH (1994) Effect of light quality (red:far-red ratio) at the apical bud of the main stolon on morphogenesis of *Trifolium repens* L. Annals of Botany **74:** 119-123

Rockwell NC, Su YS, Lagarias JC (2006) Phytochrome structure and signaling mechanisms. Annu. Rev. Plant Biol. **57:** 837-858

Roitsch T (1999) Source-sink regulation by sugar and stress. Current Opinion in Plant Biology **2:** 198-206

Roitsch T, Gonzalez MC (2004) Function and regulation of plant invertases : sweet sensations. TRENDS in Plant Science **9:** 606-613

Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. Annual Review of Plant Biology **57:** 675-709

- S -

Sack L, Melcher PJ, Zwieniecki MA, Holbrook NM (2002) The hydraulic conductance of the angiosperm leaf lamina: a comparison of three measurement methods. Journal of Experimental Botany **53:** 2177-2184

Sakamoto K, Briggs WR (2002) Cellular and subcellular localization of phototropin 1. The Plant Cell **14:** 1723-1735

Sakamoto T, Miura K, Itoh H, Tatsumi T, Ueguchi-Tanaka M, Ishiyama K, Kobayashi M, Agrawal GK, Takeda S, Abe K, Miyao A, Hirochika H, Kitano H, Ashikari M, Matsuoka M (2004) An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants un rice. Plant Physiology **134:** 1642-1653

Salisbury FJ, Hall A, Grierson CS, Halliday KJ (2007) Phytochrome coordinates Arabidopsis shoot and root development. The Plant Journal **50:** 429-438

Salomon M, Knieb E, von Zeppelin T, Rüdiger W (2003) Mapping of low- and high-fluence autophosphorylation sites in phototropin 1. Biochemistry **42:** 4217-4225

Sampedro J, Cosgrove D (2005) The expansin superfamily. Genome Biology **6:** 242

Sampedro J, Carey RE, Cosgrove D (2006) Genome histories clarify evolution of the expansin superfamily : new insights from the poplar genome and pine ESTs. Journal of Plant Research **119:** 11-21

Sancar A (2003) Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. Chemical Reviews **103:** 2203-2237

Sane AP, Tripati SK, Nath P (2007) Petal abscission in rose (*Rosa bourboniana* var Gruss an Teplitz) is associated with the enhanced expression of an alpha expansin gene, *RbEXPA1*. Plant Science **172:** 481-487

Sasidharan R, Chinnappa CC, Voesenek LA, Pierik R (2008) The regulation of cell wall extensibility during shade avoidance: a study using two contrasting ecotypes of *Stellaria longipes*. Plant Physiology **148:** 1557-1569

Sauer N (2007) Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. FEBS Letters **581:** 2309-2317

Saure MC (1985) Dormancy release in deciduous fruit trees. Horticultural Reviews **7**

Schafer E, Nagy F (2006) Photomorphogenesis in Plants and Bacteria : Function and signal Transduction Mechanisms. Springer, 662p

Schluepmann H, Pellny T, van Dijken A, Smeekens S, Paul M (2003) Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100:** 6849-6854

Seitz B, Klos C, Wurm M, Tenhaken R (2000) Matrix polysaccharide precursors in Arabidopsis cell walls are synthesized by alternative pathways with organ-specific expression patterns. The Plant Journal **21:** 537-546

SEM Régionale des Pays de la Loire (2008) Les Pays de la Loire et l'horticulture ornementale : une économie florissante, 3p (http://www.sem-paysdelaloire.fr/)

Seo M, Hanada A, Kuwahura A, Endo A, Okamoto M, Yamauchi Y, North H, Marion-Poll A, Sun TP, Koshiba T, Kamiya Y, Yamaguchi S, Nambara E (2006) Regulation of hormone metabolism in Arabidopsis seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism. Plant Journal **48:** 354-366

Seo M, Nambara E, Choi G, Yamaguchi S (2009) Interaction of light and hormone signals and germinating seeds. Plant Molecular Biology **69:** 463-472

Shakya R, Sturm A (1998) Characterization of source- and sink-specific sucrose/H^+ symporters from carrot. Plant Physiology **118:** 1473-1480

Shalitin D, Yang H, Mockler TC, Maymon M, Guo H, Whitelam GC, Lin C (2002) Regulation of *Arabidopsis* cryptochrome 2 by blue-light-dependent phosphorylation. Nature **417:** 763-767

Shalitin D, Yu X, Maymon M, Mockler TC, Lin C (2003) Blue light-dependent *in vivo* and *in vitro* phosphorylation of *Arabidopsis* cryptochrome 1. Plant Cell **15:** 2421-2429

Sharova EI (2008) Expansins : proteins involved in cell wall softening during plant growth and morphogenesis. Russian Journal of Plant Physiology **54:** 713-727

Sharrock RA, Quail PH (1989) Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana* : structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. Genes and Development **3:** 1745-1757

Shcherban TY, Shi J, Durachko DM, Guiltinan MJ, McQueen-Mason S, Shieh M, Cosgrove D (1995) Molecular cloning and sequence analysis of expansins : a highly conserved, multigene family of proteins that mediate cell wall extension in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **92:** 9245-9249

Shen Y, Khanna R, Carle C, Quail PH (2007) Phytochrome induces rapid PIF5 phosphorylation and degraation in response to red-light activation. Plant Physiology **145:** 1043-1051

Sheperd RE (1954) History of the rose. MacMillan ed, New York, 264p

Sherson SM, Alford HL, Forbes SM, Wallace G, Smith SM (2003) Roles of cell-wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of *Arabidopsis*. Journal of Experimental Botany **54:** 525-531

Shichijo C, Tanako O, Hashimoto T (2005) Photoregulation of seed germination. *In :* Handbook of seed science and technology, AR Basra ed, Ed Food produc press, USA, pp 343-366

Shikata M, Matsuda Y, Ando K, Nishii A, Takemura M, Yokota A, Kohchi T (2004) Characterization of *Arabidopsis ZIM*, a member of a novel plant-specific GATA factor gene family. Journal of Experimental Botany **55:** 631-639

Skinner RH, Simmons SR (1993) Modulation of leaf elongation, tiller appearance and tiller senescence in spring barley by far-red light. Plant, Cell and Environment **16:** 555-562

Smith H (2000) Phytochromes and light signal perception by plants - an emerging synthesis. Nature **407:** 585-591

Snowden KC, Napoli CA (2003) A quantitative study of lateral branching in petunia. Functional Plant Biology **30:** 987-994

Sokolova SV, Balakshina NO, Krasavina MS (2002) Activation of soluble acid invertase accompanies the cytokinin-induced source-sink leaf transition. Russian Journal of Plant Physiology **49:** 86-91

Somers DE, Sharrock RA, Tepperman JM, Quail PH (1991) The *hy3* long hypocotyl mutant of Arabidopsis is deficient in phytochrome B. The Plant Cell **3:** 1263-1274

Somers DE, Devlin PF, Kay SA (1998) Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the *Arabidopsis* circadian clock. Science **282:** 1488-1490

Sood S, Vyas D, Nagar PK (2006) Physiological and biochemical studies during flower development in two rose species. Scientia Horticulturae **108:** 390-396

Stadler R, Büttner M, Ache P, Hedrich R, Ivashikina N, Melzer M, Shearson SM, Smith SM, Sauer N (2003) Diurnal and light-regulated expression of AtSTP1 in guard cells of Arabidopsis. Plant Physiology **133:** 528-537

Stafstrom JP (2000) Regulation of growth and dormancy in pea axillary buds. *In*: Dormancy in plants: from whole plant behaviour to cellular control. J.D. Viémont and J. Crabbé eds, CABI Publishing, Angers, pp 331-346

Stirnberg P, van de Sande K, Leyser O (2002) *Max1* and *max2* control shoot lateral branching in Arabidopsis. Development **129:** 1131-1141

Stirnberg P, Furner IJ, Leyser O (2007) MAX2 participates in an SCF complex which acts locally at the node to suppress shoot branching. The Plant Journal **50:** 80-94

Sturm A, Lienhard S, Schatt S, Hardegger M (1999) Tissue-specific expression of two genes for sucrose synthase in carrot (*Daucus carota* L.). Plant Molecular Biology **39:** 349-360

Sturm A (1999) Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. Plant Physiology **121:** 1-7

Sturm A, Tang GQ (1999) The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. TRENDS in Plant Science **4:** 401-407

Subbaiah CC, Palaniappan A, Dincan K, Rhoads DM, Huber SC, Sachs MM (2006) Mitochondrial localization and putative signaling function of sucrose synthase in maize. Journal of Biological Chemistry **281:** 15625-15635

Substrats (2007) L'Anjou, "au nom de la rose", 6p

Sun TP, Gubler F (2004) Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. Annual Review of Plant Biology **55:** 197-223

Sutsawat D, Yamada K, Shiratake K, Kanayama Y, Yamaki S (2008) Properties of sorbitol dehydrogenase in strawberry fruit and enhancement of the activity by fructose and auxin. Journal of the Japananese Society for Horticultural Science **77:** 318-323

Suzue Y, Tsukuda M, Hatano S, Kanayama Y, Yamada K, Shiratake K, Yamaki S (2006) Changes in the activity and gene expression of sorbitol- and sucrose-related enzymes with leaf development of 'La France' pear. Journal of the Japananese Society for Horticultural Science **75:** 45-50

- T -

Takenaka A (2000) Shoot growth responses to light microenvironment and correlative inhibition in tree seedlings under a foresty canopy. Tree Physiology **20:** 987-991

Talon M, Koornneef M, Zeevaart JAD (1990) Endogenous gibberellins in *Arabidopsis thaliana* and possible steps blocked in the biosynthetic pathways of the semidwarf *ga4* and *ga5* mutants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **87:** 7983-7987

Taylorson RB (1991) Interactions of alcohols and increased air pressure on *Echinochloa crus-galli* (L) Beauv. seed germination. Annals of Botany **68:** 337-340

Tepperman JM, Zhu T, Chang HS, Wang X, Quail PH (2001) Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome A signaling. Proc Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98:** 9437-9442

Tepperman JM, Hudson ME, Khanna R, Zhu T, Chang SH, Wang X, Quail PH (2004) Expression profiling of *phyB* mutant demonstrates substantial contribution of other phytochromes to red-light-regulated gene expression during seedling de-etiolation. The Plant Journal **38:** 725-739

Terzaghi WB, Cashmore AR (1995) Light-regulated transcription. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **46:** 445-474

Testu C (1984) Roses anciennes. Flammarion, Paris, 247p

Thomas B, Vince Prue D (1997) Photoperiodism in plants. Academic Press, Londres, 428p

Tokuhisa JG, Daniels SM, Quail PH (1985) Phytochrome in green tissue : spectral and immunochemical evidence for two distinct molecular species of phytochrome in light-grown *Avena sativa* L. Planta **164:** 321-332

Toledo-Ortiz G, Huq E, Quail PH (2003) The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family. Plant Cell **15:** 1749-1770

Tort M (1996) Réflexions sur les mécanismes de régulation de l'activité des méristèmes caulinaires. *In* JD Viémont, ed, Activité méristématique caulinaire : de la cytologie et de la biologie moléculaire à la morphogenèse, Vol Xème Colloque "Groupe d'Etude de l'Arbre", Angers, pp 10-20

Toyomasu T, Yamane H, Murofushi N, Inoue Y (1994) Effects of exogenously applied gibberellin and red light on the endogenous levels of abscisic acid in photoblastic lettuce seeds. Plant and Cell Physiology **35:** 127-129

Tsukaya H (2005) Leaf shape : genetic controls and environmental factors. International Journal of Developmental Biology **49:** 547-555

Tsukaya H (2006) Mechanism of leaf-shape determination. Annual Review of Plant Biology **57:** 477-496

Tyree MT, Nardini A, Salleo S, Sack L, El Omari B (2005) The dependence of leaf hydraulic conductance on irradiance during HPFM measurements: any role for stomatal response? Journal of Experimental Botany **56:** 737-744

- U & V -

Ulm R, Baumann A, Oravecz A, Maté Z, Adam E, Oakeley EJ, Schafer E, Nagy F (2004) Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101:** 1397-1402

Ulm R, Nagy F (2005) Signalling and gene regulation in response to ultraviolet light. Current Opinion in Plant Biology **8:** 477-482

Usami T, Mochizuki N, Kondo M, Nishimura M, Nagatani A (2004) Cryptochromes and phytochromes synergistically regulate *Arabidopsis* root greening under blue light. Plant and Cell Physiology **45:** 1798-1808

Usenik V, Kastelec D, Veberic R, Stampar F (2008) Quality changes during ripening of plums (*Prunus domestica* L.). Food Chemistry **111:** 830-836

Vaast P, Bertrand B, Perriot J-J, Guyot B, Génard M (2006) Fruit thinning and shade improve bean characteristics and beverage quality of coffee (*Coffea arabica* L.) under optimal conditions. Journal of the Science of Food and Agriculture **86:** 197-204

Van Volkenburgh E, Cleland RE (1980) Proton excretion and cell expansion in bean leaves. Planta **148:** 273-278

Van Volkenburgh E (1999) Leaf expansion - an integrating plant behaviour. Plant, Cell and Environment **22:** 1463-1473

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biology **3:** research0034.0031-0034.0011

Vargas WA, Pontis HG, Salerno GL (2008) New insights on sucrose metabolism : evidence for an active A/N-Inv in chloroplasts uncovers a novel component of the intracellular carbon trafficking. Planta **227:** 795-807

Villain P, Mache R, Zhou D-X (1996) The mechanism of GT element-mediated cell type-specific transcriptional control. The Journal of Biological Chemistry **271:** 32593-32598

Viniflhor - TNS Sofrès (2008) Les achats de végétaux d'extérieur en 2007, 1p (http://www.viniflhor.fr/)

Vissenberg K, Fry SC, Pauly M, Hofte H, Verbelen JP (2005) XTH acts at the microfibril-matrix interface during cell elongation. Journal of Experimental Botany **56:** 673-683

Vogler H, Caderas D, Mandel T, Kuhlemeier C (2003) Domains of expansin gene expression define growth regions in the shoot apex of tomato. Plant Molecular Biology **53:** 267-272

- W -

Wan C, Sosebee RE (1998) Tillering responses to red:far-red light ratio during different phenological stages in *Eragrostis curvula*. Environmental and Experimental Botany **40:** 247-254

Wang H, Deng X-W (2004) Phytochrome signaling mechanism. The Arabidopsis Book**:** 1-28

Wang XQ, Huang WD, Zhan JC (2005) Effect of low light on the activity of sucrose synthase in leaves of nectarine. Journal of Horticultural Science & Biotechnology **80:** 358-362

Watari J, Kobae Y, Yamaki S, Yamada K, Toyofuku K, Tabuchi T, Shiratake K (2004) Identification of sorbitol transporters expressed in the phloem of apple source leaves. Plant and Cell Physiology **45:** 1023-1041

Weber H, Heim U, Golombek S, Borisjuk L, Wobus U (1998) Assimilate uptake and the regulation of seed development. Seed Science Research **8:** 331-345

Welling A, Rinne P, Viherä-Aarnio A, Kontunen-Soppela S, Heino P, Palva ET (2004) Photoperiod and temperature differentially regulate the expression of two dehydrin genes during overwintering of birch (*Betula pubescens* Ehrh.). Journal of Experimental Botany **55:** 507-516

Werner T, Schmülling T, Motyka V, Laucou V, Smets R, Van Onckelen H (2003) Cytokinin-deficient transgenic Arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. Plant Cell **15:** 2532-2550

Whitelam GC, Johnson E, Peng J, Carol P, Anderson L, Cowl JS, Harberd NP (1993) Phytochrome A null mutants of Arabidopsis display a wild-type phenotype in white light. The Plant Cell **5:** 757-768

Whitelam GC, Halliday KJ (2007) Light and Plant Development. Blackwell Publishing, Oxford, 325p

Williams MW, Raese JT (1974) Sorbitol in tracheal sap of apple as related to temperature. Physiologia Plantarum **30:** 49-52

Winter H, Huber SC (2000) Regulation of sucrose metabolism in higher plants : localization and regulation of activity of key enzymes. Critical Reviews in Plant Sciences **19:** 31-67

Wissemann V (2003) Conventional taxonomy (wild roses). *In:* Encyclopedia of Rose Science. A Roberts, T Debener, S Gudin, eds, Academic Press, London, pp 111-117

- Y -

Yamada K, Mori H, Yamaki S (1999) Gene expression of NAD-dependent sorbitol dehydrogenase during fruit development of apple (*Malus pumila* Mill. var. domestica Schneid.). Journal of the Japananese Society for Horticultural Science **68:** 1099-1103

Yamada K, Niwa N, Shiratake K, Yamaki S (2001) cDNA cloning of NAD-dependent sorbitol dehydrogenase from peach fruit and its expression during fruit development. Journal of Horticultural Science & Biotechnology **76:** 581-587

Yamada K, Suzue Y, Hatano S, Tsukuda M, Kanayama Y, Shiratake K, Yamaki S (2006) Changes in the activity and gene expression of sorbitol- and sucrose-related enzymes associated with development of 'La France' pear fruit. Journal of the Japananese Society for Horticultural Science **75:** 38-44

Yamada K, Ito M, Oyama T, Nakada M, Maesaka M, Yamaki S (2007) Analysis of sucrose metabolism during petal growth of cut roses. Postharvest Biology and Technology **43:** 174-177

Yamaguchi H, Kanayama Y, Yamaki S (1994) Purification and properties of NAD-dependent sorbitol dehydrogenase from apple fruit. Plant and Cell Physiology **35:** 887-892

Yamaki S (1982) Localization of sorbitol oxidase in vacuoles and other subcellular organelles in apple cotyledons. Plant and Cell Physiology **23:** 891-899

Yamaki S (1984) $NADP^+$-dependent sorbitol dehydrogenase found in apple leaves. Plant and Cell Physiology **25:** 1323-1327

Yang HQ, Tang RH, Cashmore AR (2001) The signaling mechanism of Arabidopsis CRY1 involves direct interaction with COP1. The Plant Cell **13:** 2573-2587

Yang J, Lin R, Sullivan JH, Hoecker U, Liu B, Xu L, Deng X-W, Wang H (2005) Light regulated COP1-mediated degradation of HFR1, a transcription factor essential for light signaling in Arabidopsis. The Plant Cell **17:** 804-821

Yennawar NH, Li LC, Dudzinski DM, Tabuchi T, Cosgrove D (2006) Crystal structure and activities of EXPB1 (Zea m 1), a β-expansin and group-1 pollen allergen from maize. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103:** 14664-14671

Yooyongwech S, Horigane AK, Yoshida M, Yamaguchi M, Sekozawa Y, Sugaya S, Gemma H (2008) Changes in aquaporin gene expression and magnetic resonance imaging of water status in peach tree flower buds during dormancy. Physiologia Plantarum **134:** 522-533

Yun HS, Yoon IS, Kang BG (2002) Rapid repression of vacuolar invertase in mungbean hypocotyl segments and regulation by sucrose, auxin and light. Plant Growth Regulation **38:** 181-189

- Z -

Zenoni S, Reale L, Battista Tornielli G, Lanfaloni L, Porceddu A, Ferrarini A, Moretti C, Zamboni A, Speghini A, Ferranti F, Pezzotti M (2004) Downregulation of the *Petunia hybrida* alpha-expansin gene *PhEXP1* reduces the amount of crystalline cellulose in cell walls and leads to phenotypic changes in petal limbs. The Plant Cell **16:** 295-308

Zeuthen T (2001) How water molecules pass through aquaporins. TRENDS in Biochemical Sciences **26:** 77-79

Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W (2000) A greedy algorithm for aligning DNA sequences. Journal of Computational Biology **7:** 203-214

Zhang D, Wang Y (2002) Post-translational inhibitory regulation of acid invertase induced by fructose and glucose in developing apple fruit. Science in China Series C Life Sciences **45:** 309-321

Zhou R, Cheng L, Wayne R (2003) Purification and characterization of sorbitol-6-phosphate phosphatase from apple leaves. Plant Science **165:** 227-232

Zieslin N, Mor Y (1981) Plant management of greenhouse roses. Formation of renewal canes. Scientia Horticulturae **15:** 67-75

Zieslin N, Mor Y (1990) Light on roses. A review. Scientia Horticulturae **43:** 1-14

Zou J, Zhang S, Zhang W, Li G, Chen Z, Zhai W, Zhao X, Pan X, Xie Q, Zhu L (2006) The rice *HIGH-TILLERING DWARF1* encoding an ortholog of Arabidopsis MAX3 is required for negative regulation of the outgrowth of axillary buds. The Plant Journal **48:** 687-698

Zouaghi M (1976) Phytochrome-induced changes of beta-fructosidase activity in radish cotyledons. Planta **131:** 27-31

Publication

Annexes

ANNEXE 1 : Composition des différents milieux de culture utilisés.

1. Milieu LB

Bactotryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	5 g
Eau distillée	qsp 1 L

Le pH est ajusté à 7 avec du NaOH 2N.

Pour un milieu LB/Agar, l'agar bactériologique en poudre est ajouté (15 $g.L^{-1}$).

Le milieu est autoclavé pendant 20 min à 120°C.

L'ampicilline (stérilisée sur filtre 0,22 µm), le X-Gal et l'IPTG (stérilisé sur filtre 0,22 µm) sont ajoutés après l'autoclavage du milieu.

2. Milieu SOC

Bactotryptone	2 g
Extrait de levure	0,5 g
NaCl	0,05 g
KCl 250 mM	1 mL
MgCl2 10 mM	0,5 mL
Glucose 20 mM	2 mL
Eau distillée	qsp 100 mL

Le milieu est stérilisé sur filtre 0,22 µm, aliquoté et conservé à -20°C.

3. Milieu tampon utilisé lors de l'observation des primordia foliaires au microscope électronique à balayage

Le milieu tampon utilisé est basé sur le milieu de Murashige & Skoog (1962), auquel quelques modifications ont été apportées.

		Concentrations (en mg.mL^{-1})
Macroéléments	NH_4NO_3	1650
	KNO_3	1900
	$CaCl_2$ $2H_2O$	440
	$MgSO_4$ 7 H_2O	370
	KH_2PO_4	170
Microéléments	H_3BO_3	6,2
	$MnSO_4$, H_2O	22,3
	$ZnSO_4$, $7H_2O$	8,6
	KI	0,25
	Na_2MoO_4, $2H_2O$	0,25
	$CuSO_4$, $5H_2O$	0,025
	$CoCl_2$, $6H_2O$	0,025
Vitamines	Acide nicotinique	100
	Pyridoxine hydrochloride	100
	Thiamine hydrochloride	100
	Pantothénate de calcium	100
	L-cysteine chlorydrate	100
	Biotine	10
	$FeSO_4$ 7 H_2O	27,8
	Na_2 EDTA	37,2

Glucose 40 g.L^{-1}

<u>ANNEXE 2 :</u> Séquences des oligonucléotides (Eurofins MWG Operon) utilisés pour les RT-PCR et les RT-PCR quantitatives en temps réel.

1. Amorces utilisées pour les RT-PCR

DENOMINATION	SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE
eA01A	5'- ATC CAT TCA TCA CCA CCG ACT ACA -3'
eA01B	5'- GCA TCC TTA CTT GGG GCA GAG A -3'
PUC1	5'- GTT TTC CCA GTC ACG AC -3'
PUC2	5'- CAG GAA ACA GCT ATG AC -3'
Uexp10.3	5'- GGT GG(AT) GC(AT) TGT GG(AT) TAT GG -3'
Lexp10.4	5'- CCA GCT C(GT)G T(GC)A GC(ACT) AT -3'
URhExp20	5'- GTG GTG ATG CTT CTG GGA CT -3'
LRhExp12	5'- GCA GAA GTT TGT GGC AGT GA -3'

2. Amorces utilisées pour les RT-PCR quantitatives en temps réel

DENOMINATION	SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE	EFFICACITES
UEFROq.1	5'- TCG TTT TGC TGT GAG GGA CAT G -3'	0,898
LEFROq.2	5'- TTG GTC ACC TTG GCA CCA GAT -3'	
UGAPDHROq.5	5'- GGT GGT GCC AAG AAG GTT GTC ATC T -3'	0,843
LGAPDHROq.6	5'- GTA TTC ATG CTC ATT GAC TCC CAC AAC A -3'	
U7qEXPRosacl11	5'- GCC AAG GCT ATG GGA CTA ACA C -3'	1,110
L8qEXPRosacl11	5'- GAG CTC ATA ACA TGC TCC ACA AGT -3'	
UAIROq.4	5'- CGG CCA ACCTGT CTG ATC CCT TA -3'	0,987
LAIROq.5	5'- GGG TCA CGG AAA TCG GTG GTT AAA -3'	
USUSYROq.6	5'- AAA GAC CCT TCT CAC TGG GAC AAG A -3'	0,995
LSUSYROq.7	5'- CCA GTC AAG GTC AAG AGC CTT TCA -3'	
USDHROq.1	5'- GTG CTA CTC GTC CTG GTG GCA AAG T -3'	0,830
LSDHROq.2	5'- CGG AAG CTG AAG TAA GTG GGA GAG TCA -3'	

<u>ANNEXE 3</u> : Séquences des oligonucléotides (Oligold®, Eurogentec) utilisés lors de l'expérience de cDNA-AFLP.

DENOMINATION	SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE
oligo$(dT)_{30}$-AFLP	5'- TTT TTT GCA AGC TTG AAT TCG $CT_{30}N$ -3'
Eco+0	5'- CTC GTA GAC TGC GTA CCA ATT C -3'
Eco+1	5'- CTC GTA GAC TGC GTA CCA ATT CA -3'
	5'- CTC GTA GAC TGC GTA CCA ATT CC -3'
	5'- CTC GTA GAC TGC GTA CCA ATT CG -3'
	5'- CTC GTA GAC TGC GTA CCA ATT CT -3'
Mse+0	5'- GAC GAT GAG TCC TGA ATA A -3'
Mse+2	5'- GAC GAT GAG TCC TGA ATA AAA -3'
	5'- GAC GAT GAG TCC TGA ATA AAC -3'
	5'- GAC GAT GAG TCC TGA ATA AAG -3'
	5'- GAC GAT GAG TCC TGA ATA AAT -3'
	5'- GAC GAT GAG TCC TGA ATA ACA -3'
	5'- GAC GAT GAG TCC TGA ATA ACC -3'
	5'- GAC GAT GAG TCC TGA ATA ACG -3'
	5'- GAC GAT GAG TCC TGA ATA ACT -3'
	5'- GAC GAT GAG TCC TGA ATA AGA -3'
	5'- GAC GAT GAG TCC TGA ATA AGC -3'
	5'- GAC GAT GAG TCC TGA ATA AGG -3'
	5'- GAC GAT GAG TCC TGA ATA AGT -3'
	5'- GAC GAT GAG TCC TGA ATA ATA -3'
	5'- GAC GAT GAG TCC TGA ATA ATC -3'
	5'- GAC GAT GAG TCC TGA ATA ATG -3'
	5'- GAC GAT GAG TCC TGA ATA ATT -3'
Msp+0	5'- GAC GAT GAG TCC TGA ACG G -3'
Msp+2	5'- GAC GAT GAG TCC TGA ACG GAA -3'
	5'- GAC GAT GAG TCC TGA ACG GAC -3'
	5'- GAC GAT GAG TCC TGA ACG GAG -3'
	5'- GAC GAT GAG TCC TGA ACG GAT -3'
	5'- GAC GAT GAG TCC TGA ACG GCA -3'
	5'- GAC GAT GAG TCC TGA ACG GCC -3'
	5'- GAC GAT GAG TCC TGA ACG GCG -3'
	5'- GAC GAT GAG TCC TGA ACG GCT -3'
	5'- GAC GAT GAG TCC TGA ACG GGA -3'
	5'- GAC GAT GAG TCC TGA ACG GGC -3'
	5'- GAC GAT GAG TCC TGA ACG GGG -3'
	5'- GAC GAT GAG TCC TGA ACG GGT -3'
	5'- GAC GAT GAG TCC TGA ACG GTA -3'
	5'- GAC GAT GAG TCC TGA ACG GTC -3'
	5'- GAC GAT GAG TCC TGA ACG GTG -3'
	5'- GAC GAT GAG TCC TGA ACG GTT -3'
M13	5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT -3'

ANNEXE 4 : Tests statistiques

Le test statistique utilisé pour tous les résultats présentés ci-dessous est le test de Student.

Légende utilisée :

ns : non significatif, p > 0,05
* : 0,01 < p < 0,05
** : 0,001 < p < 0,01
*** : p < 0,001

1. *Dosage des sucres dans les bourgeons et les nœuds de rosier*

Saccharose bourgeons

	T0	24L	24O	48L	48O	72L	72O	96L	96O
T0		***	**	**	***	*	***	*	***
24L			ns	ns		***		**	
24O					ns		ns		ns
48L					**	*		**	
48O							ns		ns
72L							***	**	
72O									ns
96L									**
96O									

Glucose bourgeons

	T0	24L	24O	48L	48O	72L	72O	96L	96O
T0		ns	ns	*	**	*	**	*	*
24L			ns	**		**		**	
24O					**		**		*
48L					**	ns		ns	
48O							ns		ns
72L							*	ns	
72O									ns
96L									**
96O									

Amidon bourgeons

	T0	24L	24O	48L	48O	72L	72O	96L	96O
T0		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*
24L			ns	ns		ns		ns	
24O					ns		ns		ns
48L					ns	*		**	
48O							ns		ns
72L							*	ns	
72O									ns
96L									***
96O									

Saccharose nœuds

	T0	24L	24O	48L	48O	72L	72O	96L	96O
T0		*	**	**	***	**	***	ns	***
24L			ns	ns		ns		ns	
24O					ns		ns		ns
48L						ns		*	
48O							ns		ns
72L							***	*	
72O									**
96L									*
96O									

Glucose nœuds

	T0	24L	24O	48L	48O	72L	72O	96L	96O
T0		ns	**	**	***	ns	**	*	**
24L			ns	ns		ns		ns	
24O					ns		ns		**
48L					ns	**		***	
48O							ns		**
72L							*	ns	
72O									*
96L									*
96O									

Amidon nœuds

	T0	24L	24O	48L	48O	72L	72O	96L	96O
T0		**	**	**	**	**	**	**	**
24L			*	*		*		*	
24O					ns		ns		ns
48L					ns	ns		ns	
48O							ns		ns
72L							ns	ns	
72O									ns
96L									ns
96O									

2. *Activités enzymatiques dans les bourgeons et les nœuds de rosier*

Invertase Acide Vacuolaire (IAV) bourgeons

	T0	24L	24O	48L	48O	72L	72O	96L	96O
T0		ns	ns	**	ns	*	ns	**	*
24L			ns	**		ns		**	
24O					ns		ns		*
48L					*	ns		ns	
48O							ns		*
72L							ns	ns	
72O									ns
96L									***
96O									

Invertase Acide Pariétale (IAP) bourgeons

	T0	24L	24O	48L	48O	72L	72O	96L	96O
T0		ns	ns	**	*	ns	ns	ns	ns
24L			ns	*		*		ns	
24O					*		ns		ns
48L					ns	**			
48O							ns		**
72L							ns	**	
72O									ns
96L									*
96O									

NAD-SDH bourgeons

	T0	72L	72O	96L	96O
T0		**	*	ns	ns
72L			ns	ns	
72O					ns
96L					ns
96O					

Invertase Acide Vacuolaire (IAV) nœuds

	T0	24L	24O	48L	48O	72L	72O	96L	96O
T0		**	**	**	ns	ns	ns	ns	ns
24L			*	*		ns		ns	
24O					ns		ns		ns
48L					ns	ns		ns	
48O							ns		ns
72L							ns	ns	
72O									ns
96L									ns
96O									

Invertase Acide Pariétale (IAP) nœuds

	T0	24L	24O	48L	48O	72L	72O	96L	96O
T0		***	*	**	**	*	*	*	***
24L			ns	ns		*		ns	
24O					ns		ns		ns
48L					ns	*		ns	
48O							ns		ns
72L							ns	ns	
72O									ns
96L									ns
96O									

NAD-SDH nœuds

	T0	72L	72O	96L	96O
T0		ns	ns	*	**
72L			ns	ns	
72O					ns
96L					**
96O					

3. *Expression génique au sein des bourgeons (RT-PCR quantitative en temps réel)*

Expansine (RhEXP)

	T0	24L	24O	48L	48O	72L	72O	96L	96O
T0		*	**	ns	***	ns	***	ns	***
24L			*	ns		ns		ns	
24O					**		**		**
48L					**	ns		ns	
48O							ns		ns
72L							*	ns	
72O									ns
96L									**
96O									

NAD-SDH

	T0	24L	24O	48L	48O	72L	72O	96L	96O
T0		**	*	*	**	*	*	*	***
24L			**	ns		ns		ns	
24O					*		*		**
48L					**	ns		ns	
48O							ns		*
72L							*	ns	
72O									ns
96L									***
96O									

NAD-SDH

	T0	1L	1O	6L	6O	10L	10O
T0		ns	ns	**	*	*	***
1L			ns	ns		ns	
1O					ns		ns
6L					**	*	
6O							ns
10L							**
10O							

SuSy

	T0	24L	24O	48L	48O	72L	72O	96L	96O
T0		ns	***	ns	***	**	***	***	***
24L			*	ns		**		ns	
24O					**		**		*
48L					***	*		*	
48O							ns		ns
72L							***	**	
72O									ns
96L									***
96O									

Invertase Acide Vacuolaire (IAV)

	T0	24L	24O	48L	48O	72L	72O	96L	96O
T0		***	*	*	**	*	*	**	ns
24L			***	ns		ns		ns	
24O					ns		ns		ns
48L					*	ns		ns	
48O							ns		ns
72L							*	ns	
72O									ns
96L									*
96O									

Invertase Acide Vacuolaire (IAV)

	T0	1L	1O	6L	6O	10L	10O
T0		ns	ns	ns	ns	ns	ns
1L			ns	ns		ns	
1O					ns		ns
6L					ns	ns	
6O							ns
10L							ns
10O							

Plant, Cell and Environment (2008) **31**, 1534–1544 doi: 10.1111/j.1365-3040.2008.01856.x

Light controls shoot meristem organogenic activity and leaf primordia growth during bud burst in *Rosa* sp.

TIFFANIE GIRAULT[1], VERONIQUE BERGOUGNOUX[1], DIDIER COMBES[2], JEAN-DANIEL VIEMONT[1] & NATHALIE LEDUC[1]

[1]*Université d'Angers, UFR Sciences, UMR-462 SAGAH (Université d'Angers, INH, INRA) 2,Bd Lavoisier, F-49045 Angers cedex, France and* [2]*INRA, UR4 URP3F, Equipe d'Ecophysiologie des Plantes Fourragères,BP-6, F-86600, Lusignan, France*

ABSTRACT

Light controls bud burst in many plants, which subsequently affects their architecture. Nevertheless, very little is known about this photomorphogenic process. This study ascertains the effects of light on bud burst and on two of its components, i.e. growth of preformed leaves and meristem organogenesis in six cultivars from three *Rosa* species (*R. hybrida* L., *R. chinensis* L., *R. wichurana* L.). Defoliated plants were severed above the third basal bud and exposed, either to darkness or to different intensities of white light, to blue, red or to FR, at constant temperature. Bud bursting was inhibited in darkness in the six cultivars of *Rosa*, but not in *Arabidopsis*, tomato and poplar plants under the same condition. In all *Rosa* cultivars, bud burst, growth of preformed leaves and meristem organogenesis were triggered by blue and red lights, and extended by increasing light intensities. FR was inhibitory of bud burst. Partial shading experiments demonstrated that bud and not stem was the active site for light perception in bud burst.

Key-words: Axillary bud; leaf development; photomorphogenesis.

Abbreviations: CRY, cryptochrome; FR, far-red light; PHY, phytochrome; PPFD, photosynthetic photon flux density; R, red light; SAM, shoot apical meristem.

INTRODUCTION

Either through its intensity (Bredmose 1997; Bartlett & Remphrey 1998; Niinemets & Lukjanova 2003; Kawamura & Takeda 2004; Evers *et al.* 2006) or its quality (Marks & Simpson 1999; Ballaré & Casal 2000; Muleo, Morini & Casano 2001; Heo *et al.* 2002; Evers *et al.* 2006) light can modulate a bud's capacity to burst. Hence, light can produce a significant impact upon the shoot branching of the plant and on its final architecture. Given that photomorphogenesis research mainly focuses on processes such as flowering, shade-avoidance and hypocotyl de-etiolation (Nemhauser 2008), little information is available about the photocontrol of bud burst (Kebrom, Burson & Finlayson 2006).

Preliminary studies on photoreceptor localization in plants mostly concern dry seeds (Wang, Cordonnier-Pratt & Pratt 1992), seedlings (McCurdy & Pratt 1986) and leaves (Moysset *et al.* 2001), but no study has dealt with the presence of photoreceptors in buds to date. Shading experiments where parts of plants are darkened can help find receptive sites for light in some species. For instance, in *Rosa*, such an approach prompted the conclusion that the tip of the growing shoot was an active site (Mor & Halevy 1980). However, no studies were performed on quiescent buds to determine whether they actually perceive the light signal directly.

It has been shown that R stimulated bud burst in *Disanthus cercidifolius*, *Crateagus oxyacantha*, *Rhododendron*, *Salvia splendens* (Marks & Simpson 1999) and *Rosa* (Mor, Halevy & Porath 1980) whereas FR was highly inhibitory in *Brassica juncea*, *Lilium*, several grasses (Ballaré & Casal 2000) and *Rosa* (Healy & Wilkins 1980). The R–FR reversible response in these species (Mor & Halevy 1984), as well as the reduced-branching habit in *PHYB* mutants (Reed *et al.* 1993; Childs *et al.* 1997; Kebrom *et al.* 2006) suggest the involvement of PHYs in the transduction of the light signal during bursting. Until now, no complete study has been performed in any species to assess the exact role of PHYs and of other types of photoreceptors in bud burst.

Bud burst is a complex process, involving three component mechanisms: (1) the growth of the preformed leaves; (2) the elongation of their internodes; and (3) the production by the SAM of new leaf primordia. The effect of light on bud burst has been evaluated so far as a global process (Bredmose 1997; Bartlett & Remphrey 1998; Niinemets & Lukjanova 2003; Kawamura & Takeda 2004; Evers *et al.* 2006). No fine dissection of the effect of light on these component mechanisms has been carried out. However, it is questionable whether or not light affects each of these processes. Addressing such a question should help to uncover the cellular and molecular mechanisms that are under light control during bud burst.

In this study, we investigated the impact of light on SAM organogenic activity and leaf primordia growth within buds, in order to elucidate the influence of light intensity and

Correspondence: N. Leduc. Fax: +33 241735352; e-mail: nathalie.leduc@univ-angers.fr

Journal compilation © 2008 Blackwell Publishing Ltd
No claim to original French government works

quality on both these component processes of bud burst. This study was performed in *Rosa* sp. in which it had been previously shown that basal buds of *Rosa hybrida* 'Baccara' shoots displayed an absolute requirement for light to undergo bursting (Khayat & Zieslin 1982). In the present work, three species and six varieties of *Rosa* were used in order to assess genotypic differences in light responses. We also compared differences between genera, on the basis of the response of axillary buds to light in three model species: *Arabidopsis*, tomato and poplar. Our results constitute a first step towards the identification of the regulatory pathways of light during bud burst.

MATERIALS AND METHODS

Plant material, growth conditions

Six cultivars belonging to three species of *Rosa* were used in the experiments: (1) *R. chinensis* 'Old blush'; (2) *R. hybrida* 'Radrazz'; (3) *R. hybrida* 'Meiprille'; (4) *R. hybrida* 'Meichibon'; (5) *R. hybrida* 'Meiratcan'; and (6) *R. wichurana* 'Basye's thornless'. All cultivars present a bushy shape, except for *R. wichurana* Basye's thornless that has a creeping growth habit.

Node bearing leaves with five or seven leaflets were harvested from the medial part of mother plant stems and used as single-node cuttings. Cuttings were inserted into FERTISS peat plugs (FERTIL, Le Syndicat, France). Rooting was achieved after a culture of 4 to 5 weeks under a high hygrometry. Well-rooted cuttings were transferred into 500 mL pots containing a mixture (70/20/10; v/v/v) of neutral peat, coco fibres and perlite. Plants were grown in a greenhouse at 25 ± 5 °C. Extra lighting was supplied by high pressure sodium-vapor lamps below 200 W/m^2 of global solar radiation. For *R. hybrida* Radrazz and *R. chinensis* Old blush, plant stems were cut 0.5 cm above the third basal five-leaflet leaf when the apical flower bud had grown 0.5 cm above the terminal leaf. For *R. hybrida* Meiprille, Meichibon, Meiratcan – characterized by a longer vegetative development – and *R. wichurana* Basye's thornless – which does not flower in our greenhouse conditions – plant stems were cut 0.5 cm above the third basal five-leaflet leaf when seven to eight true leaves had expanded on the stem. All leaves on the remaining basal part of the stems were removed, given that bud development and burst are in correlative interaction with leaves, the intensity of which is dependent on the leaf area (Le Hir *et al.* 2006). This treatment did not impair bud burst (data not shown) but improved the homogeneity of experimental plant batches. The burst of the three remaining axillary buds on the stem, respectively called from top to bottom, distal, medial and proximal buds, was followed.

In experiments dedicated to the identification of the site of light perception, the distal bud alone or the full length of the stem beneath the distal bud was wrapped either in aluminium foil to ensure total darkness, or in control plants, with a translucent film to reproduce the same reduction in air volume around the bud.

Arabidopsis thaliana L. ('Columbia') and tomato (*Solanum lycopersicum* L. 'Tresor' hybrid F1) plants were grown from seed in peat plugs for the former, and pots containing peat substrate for the latter. Poplar (*Populus tremula* × *P. tremuloïdes* L.) were obtained from *in vitro* cultures, acclimated in greenhouse and raised in pots. In *A. thaliana*, flowering shoots were excised and the development of the axillary buds from rosette leaves was monitored. For tomato and poplar plants, some of the upper parts of the vegetative stems were cut off and all the leaves removed.

In all cases, stem severing was performed between 1000 and 1200 h.

Light treatments

Upon stem severing, plants were placed in a growth cabinet (KBW720, Binder, Tuttlingen, Germany, with optional regulation of light intensity), at 23 °C, and subjected to various light treatments. White light (2, 20, 200 μmol m^{-2} s^{-1}) was produced by Osram L 18W/77 Fluora fluorescent tubes (München, Germany), blue light (200 μmol m^{-2} s^{-1}) by Philips TL-D 18W/18 fluorescent tubes and R (20 μmol m^{-2} s^{-1}) by Philips TL-D 18W/15 fluorescent tubes (Eindhoven, the Netherlands). Note that a photon fluence rate higher than 20 μmol m^{-2} s^{-1} could not be delivered by the red tubes. FR (2.7 μmol m^{-2} s^{-1}) was obtained from Osram L 18W/77 Fluora fluorescent tubes filtered with Roscolux blue filter 83 and red filter 27 (Roscolab Ltd, London, UK). The spectral distribution and the photon fluence rate of the different light sources were measured with a calibrated ultraviolet/visible spectrophotometry RAMSES (Trios GmbH, Oldenburg, Germany) spectroradiometer. Spectral distributions are shown in Supporting Information. R/FR ratios were the following: (1) 4.39 for white light; (2) 0.78 for blue light; (3) 20.27 for R; and (4) 0.25 for FR.

In all experiments, plants were subjected to a 16 h photoperiod.

Evaluation of bud bursting and leaf growth

Bud bursting and leaf growth outside the buds were evaluated after 12 d of culture. Depending on the lighting conditions, sprouted buds displayed either several fully expanded leaves or only the tip of the first leaf protruding outside the scales. Buds with at least the tip of the first leaf visible outside the scales were considered as burst buds.

The number of visible leaves outside bud scales was counted using a stereo microscope. A note of 0.5 visible leaf was ascribed to burst bud showing only the tip of the first leaf outside the scales. A note of 1, 2 or 3 was given to burst buds showing one, two or three fully expanded leaves outside the bud scales, respectively.

Evaluation of SAM organogenesis

The number of leaf-like organs (scales, young preformed leaves and leaf primordia) in distal buds was determined

Journal compilation © 2008 Blackwell Publishing Ltd
No claim to original French government works,

for three *Rosa* cultivars – *R. wichurana* Basye's thornless, *R. hybrida* Meiprille and Radrazz – 7 d after severing. Each distal bud was dissected through a stereo microscope and leaf-like organs were removed and counted until only SAM remained. SAM organogenic activity was also assessed through histological observations of buds 3 d after stem severing in *R. hybrida* Radrazz. Buds were fixed and included in resin as described in Le Hir *et al.* (2006). Ten-micrometer-thick sections were stained with toluidine blue and observed through a light microscope (Axioskop 2 plus; Zeiss, Jena, Germany).

Statistical analysis

Results shown are means ± SE of at least two separate experiments. The number of treated plants in each experiment is described in the figures. Significant differences between treatments were evaluated with the Student's *t*-test ($P \leq 0.001$***, $P \leq 0.01$**, $P \leq 0.05$*).

RESULTS

Light requirement for bud bursting in several plant species

When experimental plants from the three *Rosa* species and the six cultivars were grown in total darkness, no bud burst was observed in any of the treated plants (Table 1). Distal and medial buds swelled upon shoot severing, but no protrusion of leaves was observed (Figs 1 & 2). On the contrary, under white light (200 μmol m^{-2} s^{-1}), both distal buds and medial buds produced a shoot (Table 1, Fig. 1). When experimental *Arabidopsis,* tomato and poplar plants were transferred to darkness, both the distal buds and the buds situated underneath burst in each of the treated plants ($n = 10$ at least) as they did under white light (Fig. 1).

Effect of PPFD on bud bursting in several varieties of *Rosa*

In all the studied cultivars, increasing PPFD levels increased percent bud bursting up to 100% under the highest light intensity applied (200 μmol m^{-2} s^{-1}, Fig. 2). Surprisingly, bud burst was triggered in every cultivar by as low a PPFD as 2 μmol m^{-2} s^{-1} although this was completely lacking in total darkness. The lowest light intensities applied revealed the genotypic differences in the requirement for light. In fact, *R. hybrida* Meiprille and Meichibon appeared the most dependent on light intensity with only half of the distal buds being able to burst under low PPFD (2 μmol m^{-2} s^{-1}).

Effect of blue, R and FRs on bud burst

When plants were grown under blue or R lighting, bud burst occurred in both cases in the six cultivars (Table 2). Blue light was as efficient as white light under the same PPFD levels (200 μmol m^{-2} s^{-1}), as high percentages of bud burst were observed under both light qualities (Table 2). Under R (20 μmol m^{-2} s^{-1}), slightly lower percentages of bud burst than under white light were observed in five out of six cultivars (Table 2). *R. hybrida* Meiprille proved again to be the most sensitive to light conditions as it was the less responsive to R (Table 2).

The effect of FR was assessed in *R. hybrida* Radrazz. Twenty plants were exposed to a photon flux density of 2.7 μmol m^{-2} s^{-1} of FR for 12 d. No bud burst at all was observed under FR whereas, under a same intensity of white light, 83.3% of the distal buds from 30 experimental plants had grown out after 12 d.

Effect of PPFD on the growth of preformed leaves out of buds

An analysis was carried out on the effect of PPFD in white light upon the expansion of preformed leaves out of buds. An assessment was made in the six cultivars of the number of visible leaves out of bud scales 12 d after severing. Results depicted in Fig. 2 show a clear effect of PPFD level in all cultivars tested. Under the highest intensity (200 μmol m^{-2} s^{-1}), two to four leaves expanded out of the scales in all cultivars, whereas under lower intensities (2 and 20 μmol m^{-2} s^{-1}), only one leaf was visible. The same pattern was observed in all cultivars and *R. hybrida* Meiprille proved again to be the most light-dependent.

Table 1. Bud burst in six cultivars of *Rosa* under white light or total darkness, 12 d after stem severing

Light treatment		White light (200 μmol m^{-2} s^{-1}, 16 h/24 h)			Total darkness (24 h/24 h)		
Rosa species	Cultivar	Number of plants	Number of plants with distal bud bursted	Number of plants with medial bud bursted	Number of plants	Number of plants with distal bud bursted	Number of plants with medial bud bursted
	Radrazz	20	20	20	19	0	0
	Meiprille	19	19	19	28	0	0
	Meiratcan	18	18	18	34	0	0
Rosa hybrida	Meichibon	19	19	19	9	0	0
Rosa chinensis	Old blush	20	20	19	9	0	0
Rosa wichurana	Basye's thornless	17	17	17	30	0	0

Journal compilation © 2008 Blackwell Publishing Ltd
No claim to original French government works,

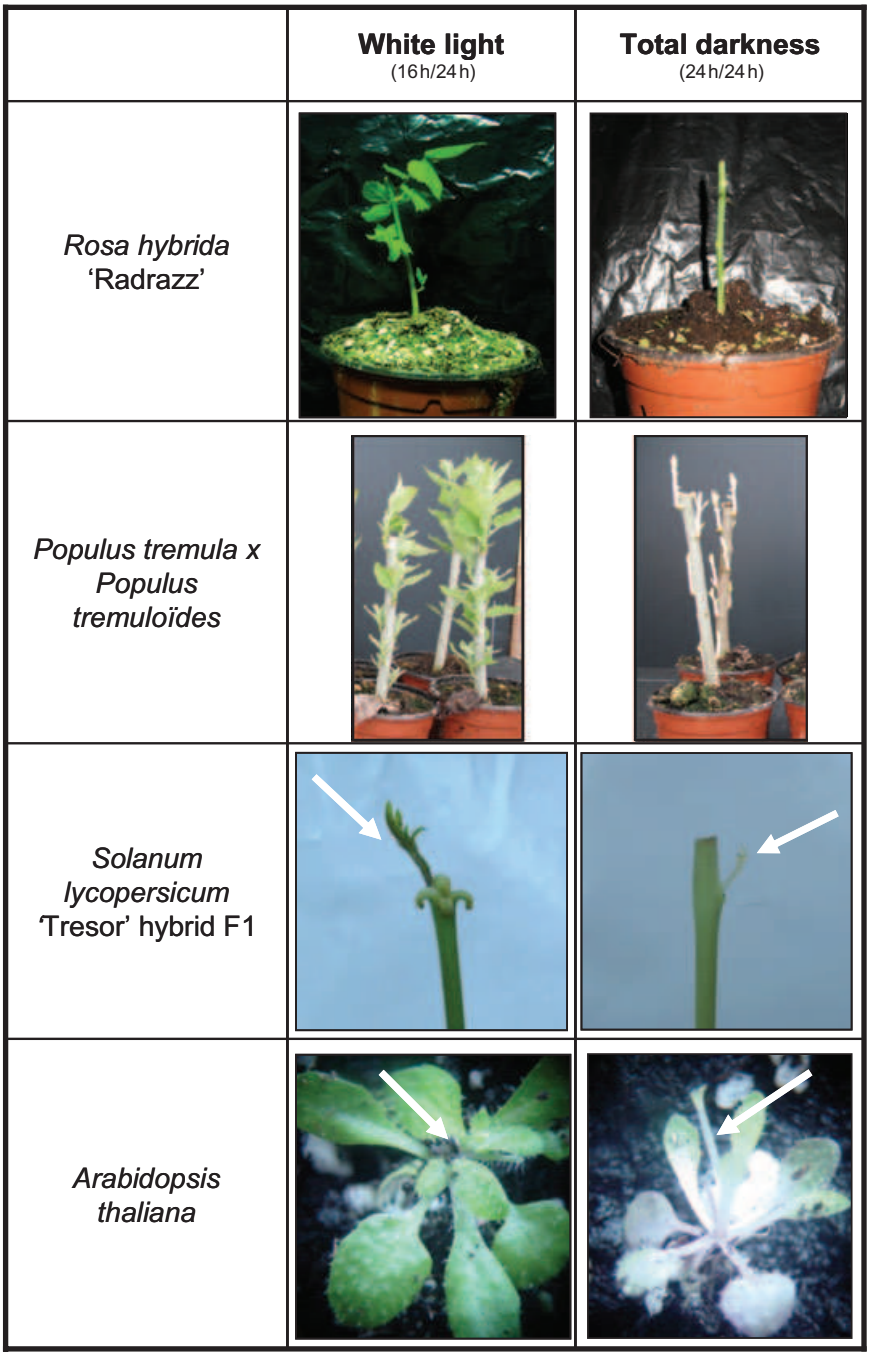


Figure 1. Bud burst in four genera under white light or total darkness, 12 d after stem severing. Arrows point to expanding axillary shoots.

Effect of blue and Rs on the growth of preformed leaves out of buds

Experimental plants from the six varieties were subjected to blue and R lighting for 12 d. The number of expanded leaves out of bud scales was monitored in each plant and compared with the development state observed under white light, at the same PPFD. The results are described in Fig. 3a,b, for blue and Rs, respectively. This experiment demonstrates that blue light alone and R alone can meet the growth requirements of preformed leaves in all cultivars. Blue light was as efficient as white light in four of the six tested cultivars. A slower growth of preformed leaves was observed under blue light for *R. hybrida* Meiratcan and Meichibon. In all cases, growth of preformed leaves was as efficient under R as under white light at the same PPFD level. Note that a better growth was even observed in *R. chinensis* Old blush under R.

Effect of PPFD on the organogenic activity of bud apical meristem

Bud meristem organogenic activity was measured in plants from three cultivars (*R. hybrida* Radrazz and

Journal compilation © 2008 Blackwell Publishing Ltd
No claim to original French government works,

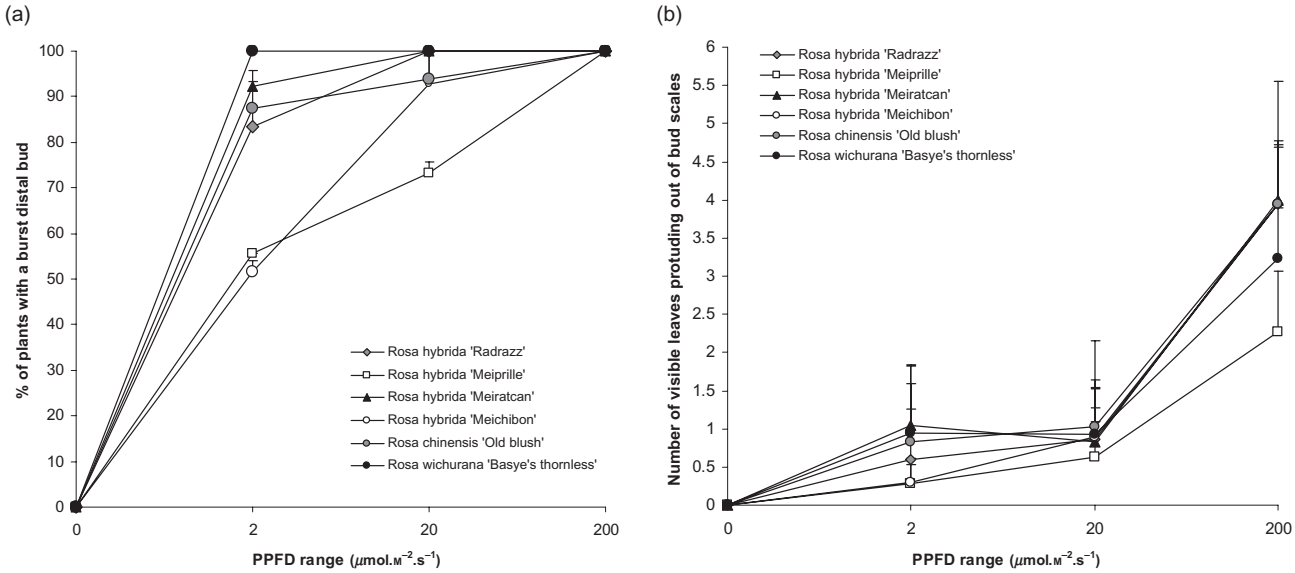


Figure 2. Percentage of plants showing a burst distal bud (a) and mean number of visible leaves out of each distal bud (b) after 12 d of culture under a range of PPFD in white light, in the six cultivars of *Rosa*. Each value is a mean of two replicates, $n = 6$ to 40 plants. Error bars represent SE.

Meiprille, *R. wichurana* Basye's thornless) grown under a range of white light PPFD (from 2 to 200 μmol m^{-2} s^{-1}). The number of leaf-like organs (primordia, preformed leaves and scales) within each bud was determined after 7 d (*T*7) and compared with that at the beginning of the culture (*T*0). SAM organogenesis was totally inhibited in two out of the three studied cultivars (*R. hybrida* Radrazz and *R. wichurana* Basye's thornless) in total darkness (Figs 4 & 5a) but also under low PPFD (2 μmol m^{-2} s^{-1}). Under higher PPFD, SAM organogenesis was dependent on light intensity, with the highest number of leaf primordia produced when plants were grown under 200 μmol m^{-2} s^{-1} (Fig. 5a).

Effect of blue and Rs on SAM organogenesis

Plants from the same three cultivars were grown under blue (200 μmol m^{-2} s^{-1}) or R (20 μmol m^{-2} s^{-1}), and the number of leaf-like organs in buds was compared after 7 d with that observed under white light, at the same PPFD. As an efficient and even higher organogenesis (in *R. wichurana* Basye's thornless) was promoted by blue light in comparison with white light (Fig. 5b). R could also promote organogenesis but only in two out of three cultivars (*R. hybrida* Radrazz, *R. wichurana* Basye's thornless) and never more efficiently than white light (Fig. 5c). No organogenesis was triggered by such R treatment for *R. hybrida* Meiprille.

Light perception by buds and stem

Using aluminium foil to fully darken stems of *R. hybrida* Radrazz plants ($n = 20$), and leaving only the distal bud exposed to light, we observed that both bud burst and further stem growth occurred under such conditions (Fig. 6a–d).

A further experiment was conducted in which the stem of *R. hybrida* Radrazz plants ($n = 16$) was left exposed to light whereas the distal bud was enclosed in aluminium foil (Fig. 6e–f). Control plants with translucent film covering the distal bud instead of foil, were cultured in order to check whether the limited air volume left around the bud could cause an inhibition of bud break (Fig. 6g,h). After 7 d, none of the darkened buds had burst (Fig. 6e,f), whereas those covered with translucent film had grown out and expanded leaves (Fig. 6g,h).

DISCUSSION

Absolute light requirement for bud bursting is not a common rule in plants

Light is one environmental factor that can modulate bud burst in plants (Bredmose 1997; Niinemets & Lukjanova 2003; Kawamura & Takeda 2004; Evers *et al.* 2006). Basal buds have been shown to have an absolute requirement for light in order to burst (Zieslin & Mor 1981) in *R. hybrida* Baccara. In this paper, we confirm this previous observation in six other cultivars from three different species of *Rosa*. We have also demonstrated that such light dependency of *Rosa* buds is not a common rule, since basal buds from three model species: *Arabidopsis*, tomato and poplar actually burst in total darkness and produce long etiolated shoots (Fig. 1). This suggests different environmental controls for bud burst among genera and means that *Rosa* is a relevant model for studying light signalling during bud burst.

Journal compilation © 2008 Blackwell Publishing Ltd
No claim to original French government works,

Table 2. Burst of distal buds in six cultivars of *Rosa* under white, blue or R, 12 d after stem severing

	Light source (16 h/24 h)	White light		Blue light		White light		R	
	PPFD level (μmol m^{-2} s^{-1})	200		200		20		20	
Rosa species	Cultivar	Number of plants	% bud burst	Number of plants	% bud burst	Number of plants	% bud burst	Number of plants	% bud burst
	Radrazz	20	100	19	100	19	100	18	94.4 ± 7.9
	Meiprille	19	100	13	100	15	73.2 ± 2.5	19	52.8 ± 3.9
	Meiratcan	18	100	13	100	6	100	14	78.6 ± 10.1
Rosa hybrida	Meichibon	19	100	16	100	14	92.9 ± 10.1	10	90.0 ± 14.1
Rosa chinensis	Old blush	20	100	11	100	16	93.7 ± 8.8	19	73.9 ± 5.5
Rosa wichurana	Basye's thornless	17	100	19	100	15	100	19	95.0 ± 7.1

Light control on bud burst in Rosa is genotype-dependent

Comparing the behavior of the *Rosa* species under the various light conditions, we have underlined a dependency on light intensities and on light qualities for all three species (Tables 1 & 2; Fig. 2). On the whole, the light control of bud burst appears to be common in the genus *Rosa*. Among the six studied cultivars, *R. hybrida* Meiprille met the highest requirement for light intensity, particularly to allow the growth of the preformed leaves (Fig. 2).This cultivar was also the most sensitive to light quality, as no organogenic activity was found under R (Fig. 5c). This suggests a genetic variability among loci involved in the control of bud break by light in *Rosa*.

Bud burst is PPFD-dependent and triggered by low light intensities

In the three species and the six varieties of *Rosa* being studied, bud burst was shown to be positively correlated with light intensity (Fig. 2). This finding is in accordance with observations by Zieslin & Mor (1981) on grafted *R. hybrida* 'Mercedes' plants subjected to decreasing PPFDs (430 to 90 μmol m^{-2} s^{-1}). Interestingly, we have shown that although *Rosa* buds have an absolute requirement for light in order to burst, low levels of irradiance (2 μmol m^{-2} s^{-1}) incited bud burst. This suggests a rather high sensitivity of the processes involved in bud burst to lighting conditions.

Blue light and R, but not FR, triggers bud burst

Bud burst was triggered by R (R/FR ratio = 20.27) in the six cultivars tested (Table 2) whereas it was inhibited by FR (R/FR ratio = 0.25) as shown for *R. hybrida* Radrazz. These results are consistent with previous observations on cut flower roses (Healy & Wilkins 1980) and also with observations in wheat where R/FR ratios below 0.35 cause the cessation of tillering (Evers *et al.* 2006). Such a reversible R–FR reaction is characteristic of PHY control on developmental processes (Nagy & Schaffer 2002; Rockwell, Su & Lagarias 2006) and may be indicative of their implication in the photo-control of bud burst in *Rosa*. In *Populus,* Howe *et al.* (1998) made the same assumption after co-localizing *PHYB* with several quantitative trait loci associated with bud burst. However, this finding cannot completely exclude the involvement of other photoreceptors in the photocontrol of bud burst. In fact, we are the first to show that blue light was inductive of bud burst in the *Rosa* genus (Table 2). The effect of blue light on bud burst has been hardly appraised in other species except for another Rosaceae, *Prunus cerasifera* (Muleo *et al.* 2001) in which blue light is also inductive. Several photoreceptors may be involved in the perception of blue light. Phototropins, CRYs, but also PHYs, actually perceive blue rays (Ohgishi *et al.* 2004). Among them, CRYs and PHYs are those mostly involved in plant photomorphogenesis (Jiao, Lau & Deng 2007). Does the blue and R induction of bud burst in *Rosa* imply the

Journal compilation © 2008 Blackwell Publishing Ltd
No claim to original French government works,

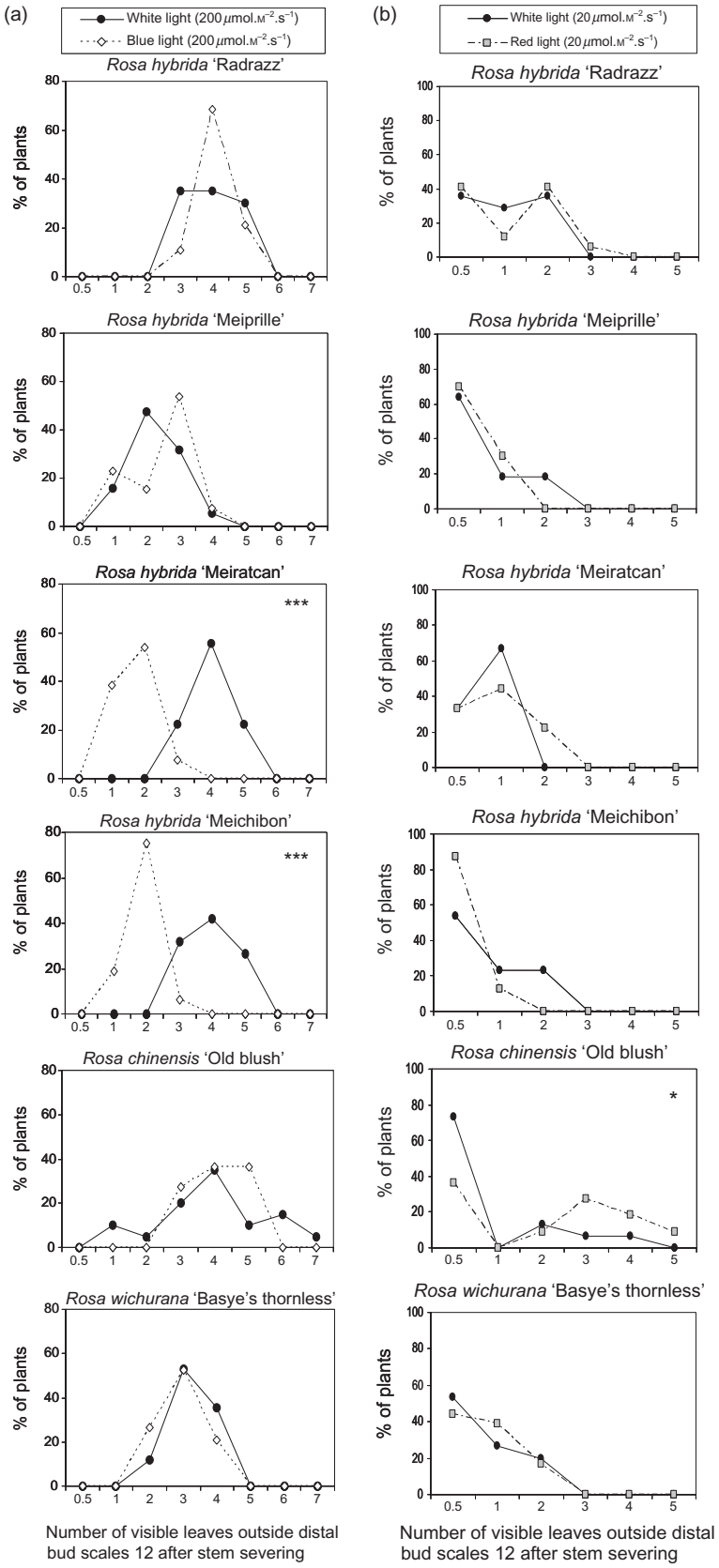


Figure 3. Relative proportion of plants with distal buds showing 0.5 to 7 protruding leaves after 12 d of culture, (a) under white light (200 μmol m^{-2} s^{-1}, 16 h/24 h) or blue light (200 μmol m^{-2} s^{-1}, 16 h/24 h), $n = 13$ to 20 plants, and B) under white light (20 μmol m^{-2} s^{-1}, 16 h/24 h) or R (20 μmol m^{-2} s^{-1}, 16 h/24 h), $n = 6$ to 20 plants. Asterisks indicate a significant difference ($P < 0.05$) between the two distributions in each cultivar.

Journal compilation © 2008 Blackwell Publishing Ltd
No claim to original French government works,

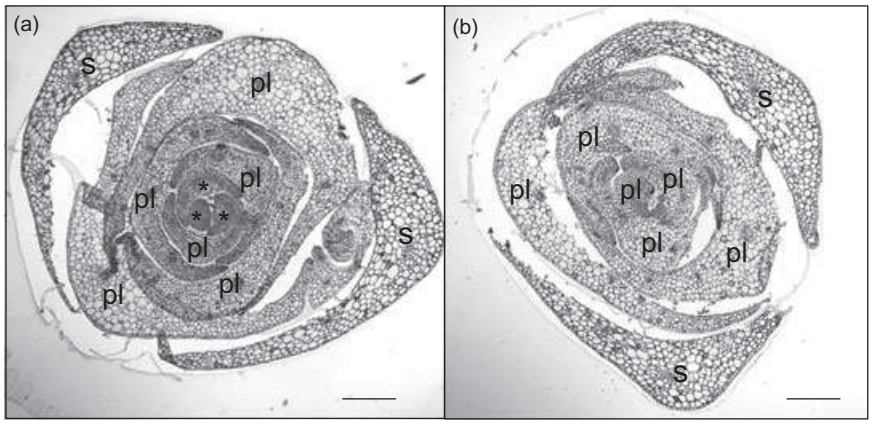


Figure 4. Cross sections through distal buds 3 d after stem severing and culture under either (a) white light (200 μmol m^{-2} s^{-1}, 16 h/24 h) or (b) full darkness. Note the accumulation of new leaf primordia (*) in (a) whereas in (b) a same number (8) of leaf-like organs as on the day of stem severing is found. S, bud scale; pl, preformed leaves. Bar = 250 μm.

involvement of both types of photoreceptors or are PHYs only those involved? Further work will aim to address this question.

The SAM organogenic activity and growth of preformed leaves are monitored by light intensity and quality

Bud burst is the result of at least three developmental processes: (1) SAM organogenesis; (2) growth of preformed leaves; and (3) internode elongation. Are all these processes under light control or only some of them? We have studied the effect of light on the first two processes and demonstrated that in *R. hybrida*, *chinensis* and *wichurana*, both were dependent on light intensity and quality.

Regarding the effect of light intensity, we have shown that bud bursting under low (2 μmol m^{-2} s^{-1}) and medium (20 μmol m^{-2} s^{-1}) PPFD were not equivalent: in the former case, bud burst involved mostly the growth of the preformed leaves whereas in the latter case, both growth of the preformed leaves and SAM organogenic activity contributed to bud bursting (Figs 3 & 5a). Hence, these component mechanisms of bud burst do not have the same thresholds of inductive irradiance: SAM organogenesis requires higher intensities for its induction, in comparison with the growth of the preformed leaves.

Nothing is known about the effect of light on either SAM activity or the growth of the preformed leaves within buds. In fact, an important field of research is developing today, focusing on the mechanisms that control SAM activity *per se* (Fleming 2006) but it contains no investigations pertaining to the impact of environmental factors on these mechanisms. Our data (Figs 4 & 5) is the first in our field to show that organogenesis was totally inhibited in the absence of light but stimulated by increasing PPFD, blue and R spectra.

The growth of the preformed leaves, the second component mechanism of bud burst, has been shown in this study to be light-dependent and enhanced with increasing PPFD (Fig. 2). Comparing our results with previous studies about light impact on growth of expanded leaves after bud burst (Niinemets, Kull & Tenhunen 1998; Granier & Tardieu 1999; Van Volkenburgh 1999), it appears that young, preformed leaves respond to low irradiance as the lamina of expanded leaves do. Indeed, a shade avoidance syndrome is described in which leaf lamina expansion is reduced in expanded leaves subjected to darkness (Tsukaya 2005). Under high light intensities, the reverse phenomenon is observed. This hypothesis is also borne out by the fact that monochromatic blue and Rs stimulated the growth of the preformed leaves in *Rosa* as they do for blades of expanded leaves in *Arabidopsis* (Kosuka *et al.* 2005).

Buds are receptive organs of the light signal

When only the distal bud was exposed to light on our experimental plants, there followed both bud burst and the growth of the shoot. Conversely, when this bud was placed into darkness with only the stem exposed to light, the hidden bud did not burst (Fig. 6). These experiments demonstrate that the stem does not contribute to the perception and the transduction of the light signal required for bud burst. The light signal is perceived by the bud itself. Light signalling in bud burst thus appears as a short range signal. An intriguing question remains: given that they are deeply unclosed under bud scales, how do the SAM and leaf pieces perceive the light signal? Immunochemical analysis on bud parts as conducted on seeds (Wang *et al.* 1992) and seedling shoots (Tokuhisa, Daniels & Quail 1985; Cordonnier, Greppin & Pratt 1986) should help us to discover the spatial distribution of the photoreceptors in buds, and understand how the light signal is transmitted.

Further work in the understanding of the photocontrol of bud burst will focus on the identification of the signalling pathways of light. To this end, we have already demonstrated that light was essential to SAM organogenic activity and to the growth of the preformed leaves, and that blue and Rs were the inductive rays. In addition, our laboratory is in the process of sequencing the differentially expressed genes during the first hours of bud development under either darkness or white light. Such work should help reveal the early steps of the signalling cascade of individual photoreceptors (Jiao *et al.* 2007) involved in bud burst, as

Journal compilation © 2008 Blackwell Publishing Ltd
No claim to original French government works,

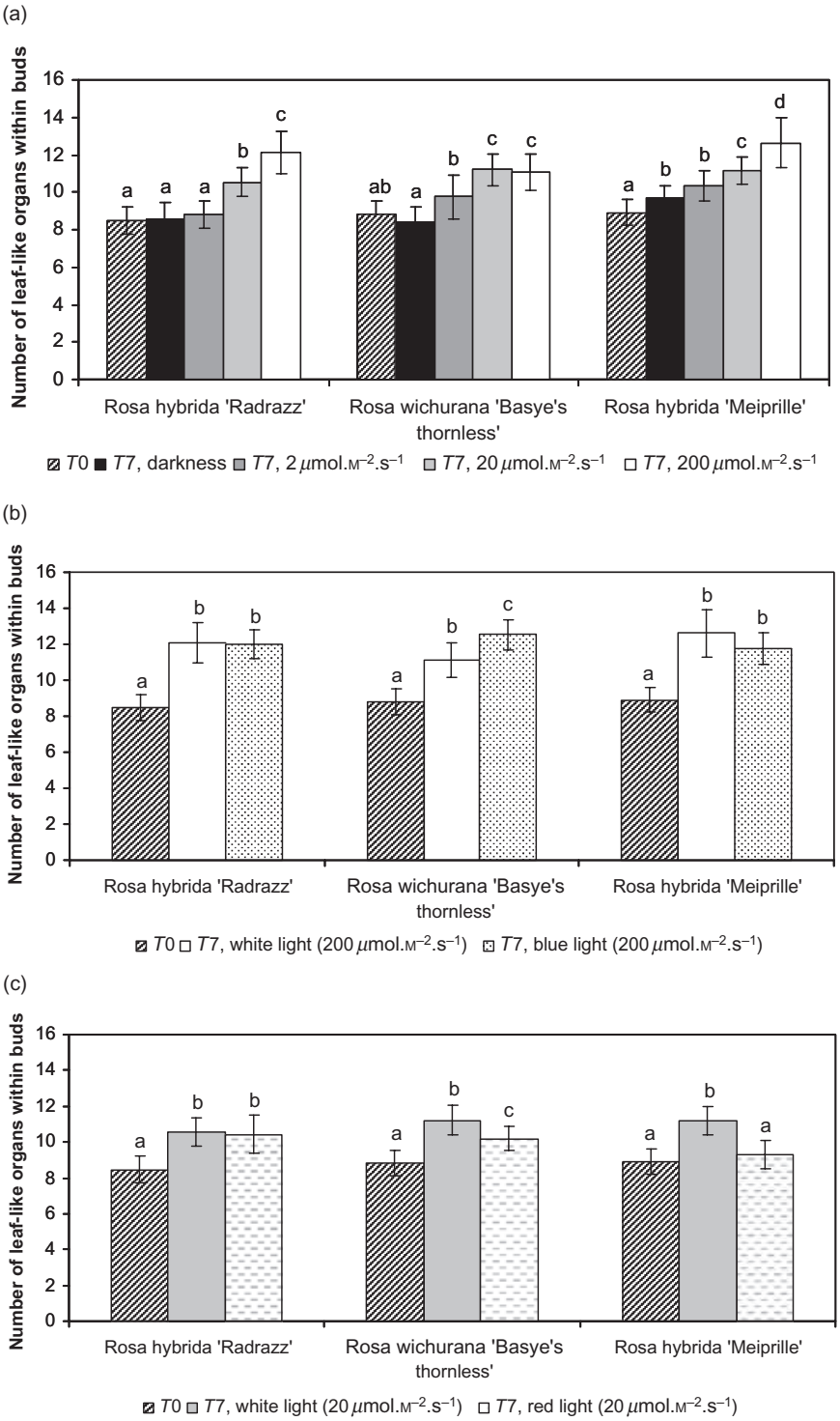


Figure 5. Mean number of leaf-like organs (primordia, young leaves and scales) within buds on the day of stem severing (*T*0) and after 7 d of culture (*T*7) under (a) a range of PPFD in white light (darkness, 2, 20 and 200 μmol m^{-2} s^{-1}, 16 h/24 h), (b) blue light or white light (200 μmol m^{-2} s^{-1}, 16 h/24 h) or (c) R or white light (20 μmol m^{-2} s^{-1}, 16 h/24 h) in three cultivars of *Rosa*. Error bars represent SE with $n = 10$ plants, at least. Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$) between mean values.

Journal compilation © 2008 Blackwell Publishing Ltd
No claim to original French government works,

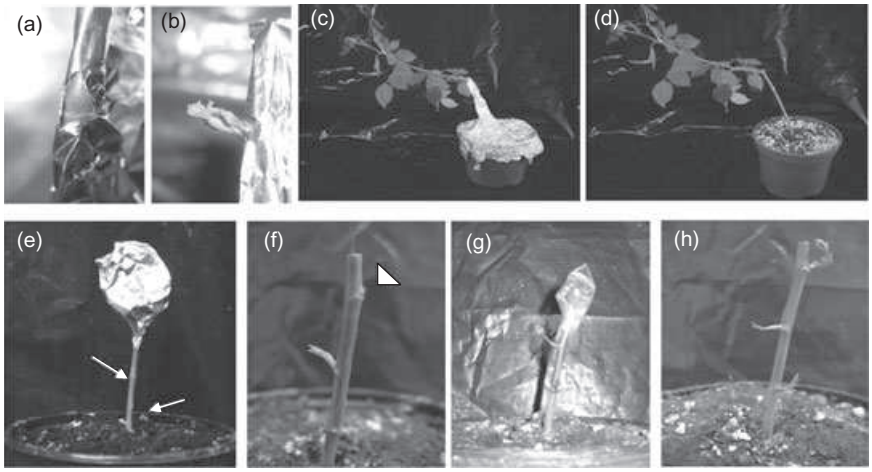


Figure 6. Effect of partial shading on the ability of buds to burst. (a) Complete shading of the stem except of distal bud, just after stem severing. (b) Seven days after (a), the exposed bud has grown out. (c) One month after (a), the exposed bud has produced a flowering shoot. (d) Same as (c), aluminium foil has been removed, lower, shaded buds did not burst under darkness. (e) Shading of the distal bud, both the stem underneath the medial and basal buds (arrows) are exposed to light. (f) Seven days after (e), the aluminium foil is removed: the distal bud did not burst (arrow head), whereas the medial has grown out. The basal bud is swollen. (g,h) Control experiment as in (e) using translucent film. Under this condition, the distal bud as well as the medial and basal buds burst after 7 d.

well as the genes involved in the light regulation of SAM organogenesis (Fleming 2006) and leaf development (Tsukaya 2006).

ACKNOWLEDGMENTS

This research was in part funded by the Région Pays de la Loire (COSAVE program). T.G. received a PhD grant from The Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. We thank Ph. Morel, S. Demotes, V. Guérin and S. Sakr for their critical reading of this paper and also M. Laffaire, S. Chalain, A. Lebrec and B. Dubuc, for their technical assistance. We are grateful to G. Pilate (INRA Orléans, France) for kindly providing the clone of *P. tremula* × *P. tremuloïdes*.

REFERENCES

Ballaré C.L. & Casal J.J. (2000) Light signals perceived by crop and weed plants. *Field Crops Research* **67,** 149–160.

Bartlett G.A. & Remphrey W.R. (1998) The effect of reduced quantities of photosynthetically active radiation on *Fraxinus pennsylvanica* growth and architecture. *Canadian Journal of Botany* **76,** 1359–1365.

Bredmose N. (1997) Chronology of three physiological development phases of single-stemmed rose (*Rosa hybrida* L.) plants in response to increment in light quantum integral. *Scientia Horticulturae* **69,** 107–115.

Childs K.-L., Miller F.-R., Cordonnier-Pratt M.-M., Pratt L.-H., Morgan P.-W. & Mullet J.-E. (1997) The sorghum photoperiod sensitivity gene Ma_3, encodes a phytochrome B1. *Plant Physiology* **113,** 611–619.

Cordonnier M.-M., Greppin H. & Pratt L.-H. (1986) Phytochrome from green avena shoots characterized with a monoclonal antibody to phytochrome from etiolated Pisum shoots. *Biochemistry* **25,** 7657–7666.

Evers J.-B., Vos J., Andrieu B. & Struik P.-C. (2006) Cessation of tillering in spring wheat in relation to light interception and red:far red ratio. *Annals of Botany* **97,** 649–658.

Fleming A.J. (2006) The co-ordination of cell division, differentiation and morphogenesis in the shoot apical meristem: a perspective. *Journal of Experimental Botany* **57,** 25–32.

Granier C. & Tardieu F. (1999) Leaf expansion and cell division are affected by reducing absorbed light before but not after the decline in cell division rate in the sunflower leaf. *Plant, Cell and Environment* **22,** 1365–1376.

Healy W.-H. & Wilkins H.-F. (1980) The effect of light quality on 'bottom-breaks' in roses. *Roses Inc. Bulletin* **November,** 71–72.

Heo J., Lee C., Chakrabarty D. & Paek K. (2002) Growth responses of marigold and salvia bedding plants as affected by monochromatic or mixture radiation provided by Light-Emitted Diode (LED). *Plant Growth Regulation* **38,** 225–230.

Howe G.-T., Bucciaglia P.-A., Hackett W.-P., Furnier G.-R., Cordonnier-Pratt M.-M. & Gardner G. (1998) Evidence that the phytochrome gene family in black cottonwood has one PHYA locus and two PHYB loci but lacks members of the PHYC/F and PHYE subfamilies. *Molecular Biology and Evolution* **15,** 160–175.

Jiao Y., Lau O.-S. & Deng X.-W. (2007) Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nature Reviews* **8,** 217–230.

Kawamura K. & Takeda H. (2004) Rules of crown development in the clonal shrub Vazccinium hirtum in a low-light understory: a quantitative analysis of architecture. *Canadian Journal of Botany* **82,** 329–339.

Kebrom T.H., Burson B.L. & Finlayson S.A. (2006) Phytochrome B represses Teosinte Branched1 expression and induces Sorghum axillary bud outgrowth in response to light signals. *Plant Physiology* **140,** 1109–1117.

Khayat E. & Zieslin N. (1982) Environmental factors involved in the regulation of sprounting of basal buds in rose plants. *Journal of Experimental Botany* **33,** 1286–1292.

Kosuka T., Horiguchi G., Kim G.-T., Ohgishi M., Sakai T. & Tsukaya H. (2005) The different growth responses of the *Arabidopsis thaliana* leaf blade and the petiole during shade avoidance

Journal compilation © 2008 Blackwell Publishing Ltd
No claim to original French government works,

are regulated by photoreceptors and sugar. *Plant and Cell Physiology* **46,** 213–223.

Le Hir R., Leduc N., Jeannette E., Viemont J.-D. & Pelleschi Travier S. (2006) Variations in sucrose and ABA concentrations are concomitant with heteroblastic leaf shape changes in a rhythmically growing species (*Quercus robur* L.) .*Tree Physiology* **26,** 229–238.

McCurdy D.-W. & Pratt L.-H. (1986) Immunogold electron microscopy pf phytochrome in Avena: identification of intracellular sites responsible for phytochrome sequestering and enhanced pellatibility. *The Journal of Cell Biology* **103,** 2541–2550.

Marks T. & Simpson S. (1999) Effect of irradiance on shoot development in vitro. *Plant Growth Regulation* **28,** 133–142.

Mor Y. & Halevy A.H. (1980) Promotion of sink activity of developing rose shoot by light. *Plant Physiology* **66,** 990–995.

Mor Y. & Halevy A.H. (1984) Dual effect of light on flowering sprouting of rose shoots. *Physiologia Plantarum* **61,** 119–124.

Mor Y., Halevy A.H. & Porath D. (1980) Characterisation of the light reaction in promoting the mobilizing ability of rose shoot tips. *Plant Physiology* **66,** 996–1000.

Moysset L., Fernadez E., Cortadellas N. & Simon E. (2001) Intracellular localization of phytochrome in *Robinia pseudoacacia* pulvini. *Planta* **213,** 565–574.

Muleo R., Morini S. & Casano S. (2001) Photoregulation of growth and branching of plum shoots: physiological action of two photosystems. *In Vitro Cellular and Development Biology* **37,** 609–617.

Nagy F. & Schaffer A. (2002) Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants. *Annual Review of Plant Biology* **53,** 329–355.

Nemhauser J.-L. (2008) Dawning of a new era: photomorphogenesis as an integrated molecular network. *Current Opinion in Plant Biology* **11,** 4–8.

Niinemets Ü. & Lukjanova A. (2003) Total foliar area and average leaf age may be more strongly associated with branching frequency than with leaf longevity in temperate conifers. *The New Phytologist* **158,** 75–89.

Niinemets Ü., Kull O. & Tenhunen J.-D. (1998) An analysis of lights effects on foliar morphology, physiology, and light interception in temperate deciduous woody species of contrasting shade tolerance. *Tree physiology* **18,** 681–696.

Ohgishi M., Saji K., Okada K. & Sakai T. (2004) Functional analysis of each blue light receptor, cry1, cry2, phot1, and phot2, by using combinatorial multiple mutants in Arabidopsis. *The Proceeding of the National Academy of Sciences* **101,** 2223–2228.

Reed J.-W., Nagpal P., Poole D.-S., Furuya M. & Chory J. (1993) Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout Arabidopsis development. *Plant Cell* **5,** 147–157.

Rockwell N.-C., Su Y.-S. & Lagarias J.-C. (2006) Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* **57,** 837–858.

Tokuhisa J.-G., Daniels S.-M. & Quail P.-H. (1985) Phytochrome in green tissue: spectral and immunochemical evidence for two distinct molecular species of phytochrome in light-grown *Avena sativa* L. *Planta* **164,** 321–377.

Tsukaya H. (2005) Leaf shape:genetic controls and environmental factors. *International Journal of Developmental Biology* **49,** 547–555.

Tsukaya H. (2006) Mechanism of leaf-shape determination. *Annual Review of Plant Biology* **57,** 477–496.

Van Volkenburgh E. (1999) Leaf expansion - an integrating plant behaviour. *Plant, Cell and Environment* **22,** 1463–1473.

Wang Y.-C., Cordonnier-Pratt M.-M. & Pratt L.-H. (1992) Detection and quantitaion of three phytochromes in unimbibed seeds of *Avena sativa* L. *Photochemistry and Photobiology* **56,** 709–716.

Zieslin N. & Mor Y. (1981) Plant management of greenhouse roses. Formation of renewal canes. *Scientia Horticulturae* **15,** 67–75.

Received 2 May 2008; received in revised form 11 July 2008; accepted for publication 11 July 2008

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Emission spectra of white, blue red and FRs for the experiments. The special distribution and the photon fluence rate of the different light sources were measured with a calibrated ultraviolet/visible spectrophotometry spectroradiometer RAMSES (Trios GmbH, Oldenburg, Germany).

Please note: Blackwell Publishing are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Journal compilation © 2008 Blackwell Publishing Ltd
No claim to original French government works,

Tableau I : *Classification des différents rosiers en fonction de critères horticoles (d'après Ferrero et al., 2003).*

	Rosiers non sarmenteux, nains ou buissonnants	**Rosiers sarmenteux**
Rosiers à grandes fleurs, non remontants	Bengale (sauf miniature) Bourbon Hybride de Rugeux *Hybride de Thé* * Noisette Pernetiana Rugueux	Bourbon Hybride de Thé Noisette Pernetiana
Rosiers à grandes fleurs, remontants	Cent feuilles Provins Rugueux Hybride remontant	Hybride remontant
Rosiers à petites fleurs, remontants	Hybride de *Floribunda* Hybride de *Polyantha* Miniature	Hybride de *Polyantha* *Wichurana*
Rosiers à petites fleurs, non remontants		Multiflore Hybride de *Wichurana*

* Groupe de rosiers cultivés pour la production de fleurs coupées

Rosier buisson à grandes fleurs

(*Rosa hybrida* 'Meicesar')

Rosier couvre-sol

(*Rosa hybrida* 'Meibonrib')

Rosier miniature

(*Rosa hybrida* 'Meivraivou')

Rosier buisson à fleurs groupées

(*Rosa hybrida* 'Meiratcan')

Rosier tige pleureur

(*Rosa hybrida* 'Meineble')

Rosier grimpant

(*Rosa hybrida* 'Meimick')

Figure 1 : *Les différents types des rosiers de jardin (crédits photo : Meilland®).*

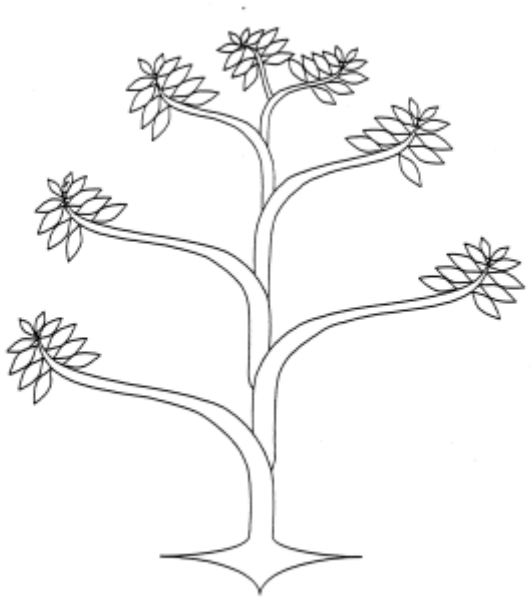


Figure 2 : *Modèle architectural de Champagnat (d'après Oldeman, 1974).*

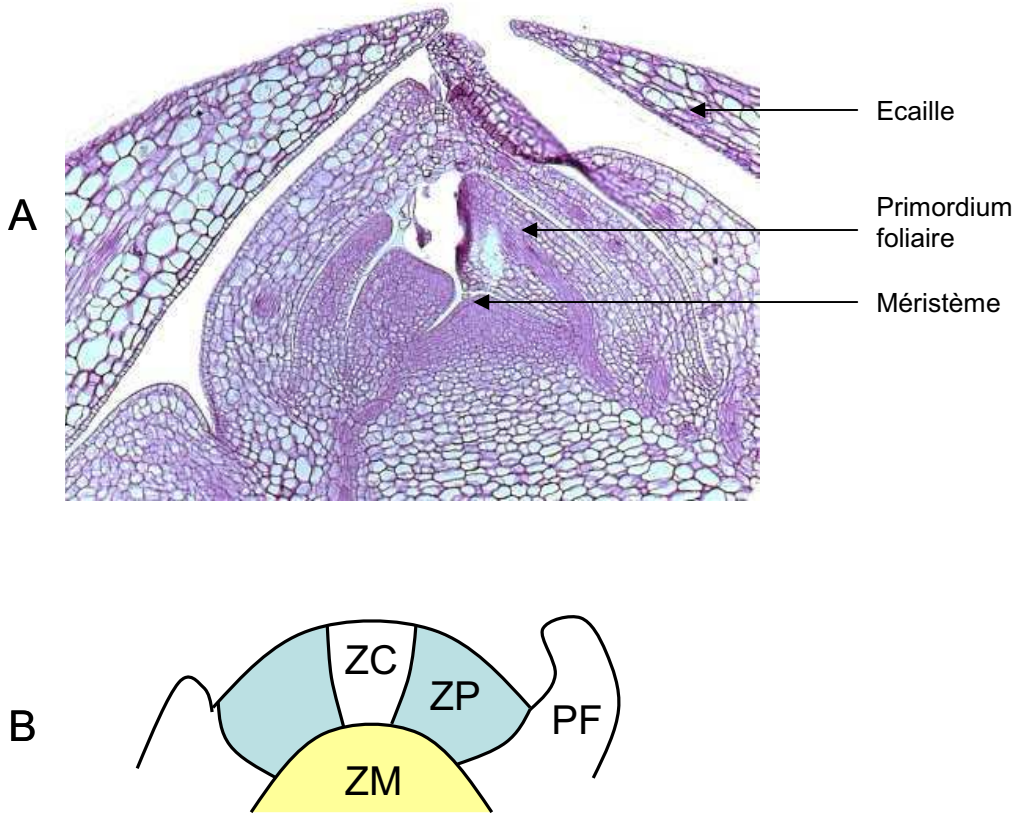


Figure 3 : *Représentations schématiques de coupes longitudinales A. d'un bourgeon axillaire (Rosa hybrida 'Radrazz') et B. d'un méristème apical caulinaire (d'après Clark, 1997).*

A. Le méristème (en bleu) est recouvert par les primordia foliaires, les jeunes feuilles et, enfin, les écailles.
B. Le méristème peut être divisé en trois zones : la zone centrale (ZC), la zone périphérique (ZP) au niveau de laquelle les primordia foliaires (PF) sont initiés et la zone médullaire (ZM).

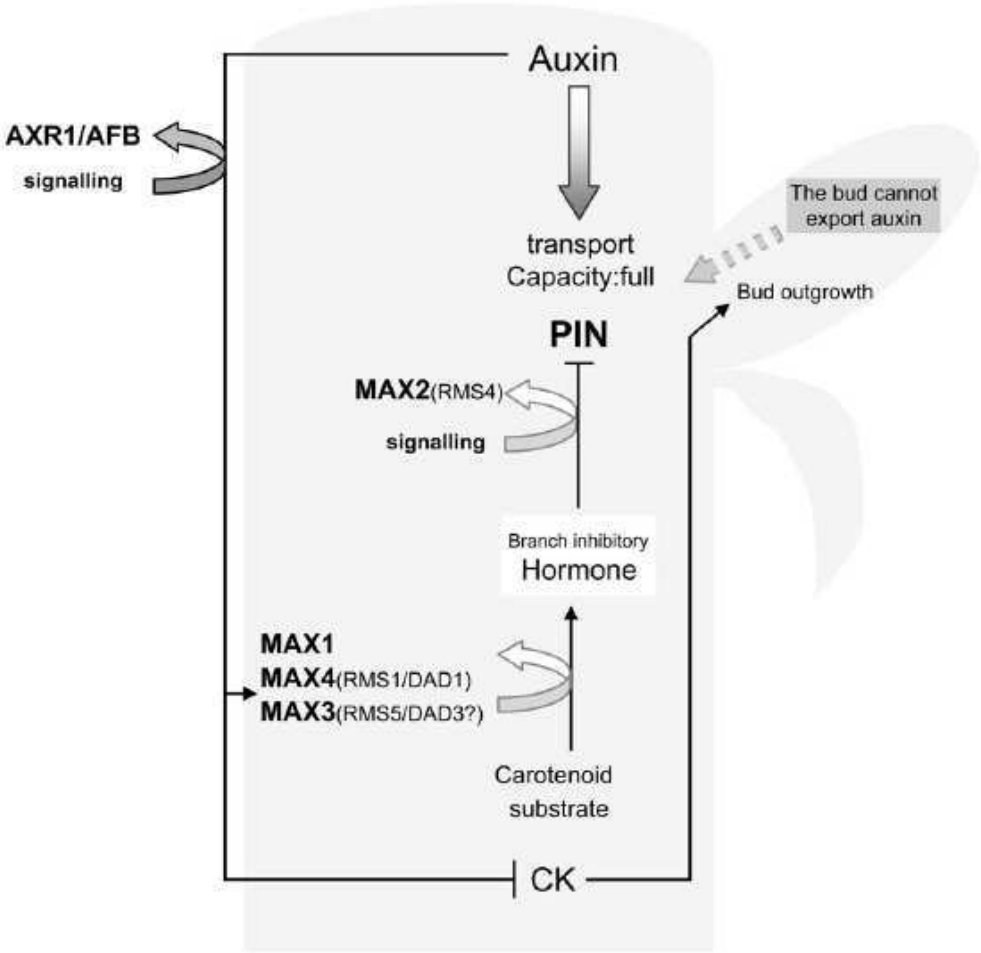


Figure 4 : *Modèle du contrôle hormonal de la ramification chez* *Arabidopsis thaliana (d'après Ongaro & Leyser, 2008).*
L'auxine, les cytokinines et une hormone inhibitrice du débourrement dérivée des caroténoïdes (la strigolactone, identifiée récemment par Gomez-Roldan *et al.* en 2008) interviennent dans le contrôle du débourrement des bourgeons axillaires.
(Les orthologues des gènes *MAX* d'*Arabidopsis thaliana* chez le pois (*RMS*) et le pétunia (*DAD*) sont écrits entre parenthèses)

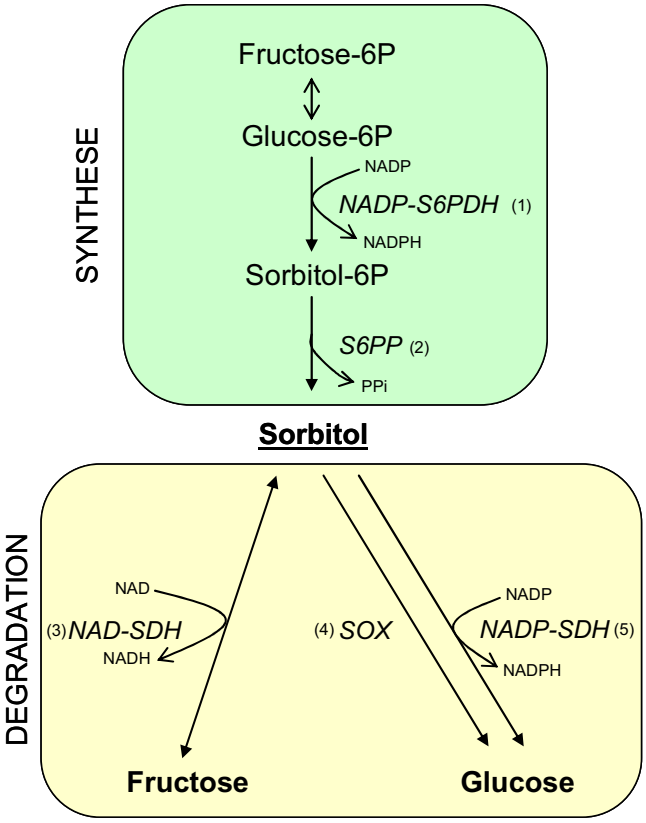


Figure 5 : *Voies de synthèse et de dégradation du sorbitol.*
La synthèse du sorbitol est réalisée à partir de Glucose-6P et grâce à l'action de deux enzymes : (1) la NAD-S6PDH (Negm & Loescher, 1981) et (2) la S6PP (Zhou *et al*., 2003). La NAD-SDH (3) a une action réversible : elle est capable de dégrader le sorbitol en fructose ou de permettre la synthèse de sorbitol à partir de fructose (Oura *et al*., 2000). La dégradation du sorbitol en glucose est possible grâce à l'action de deux enzymes : (4) la SOX (Yamaki, 1982) et (5) la NADP-SDH (Yamaki, 1984).

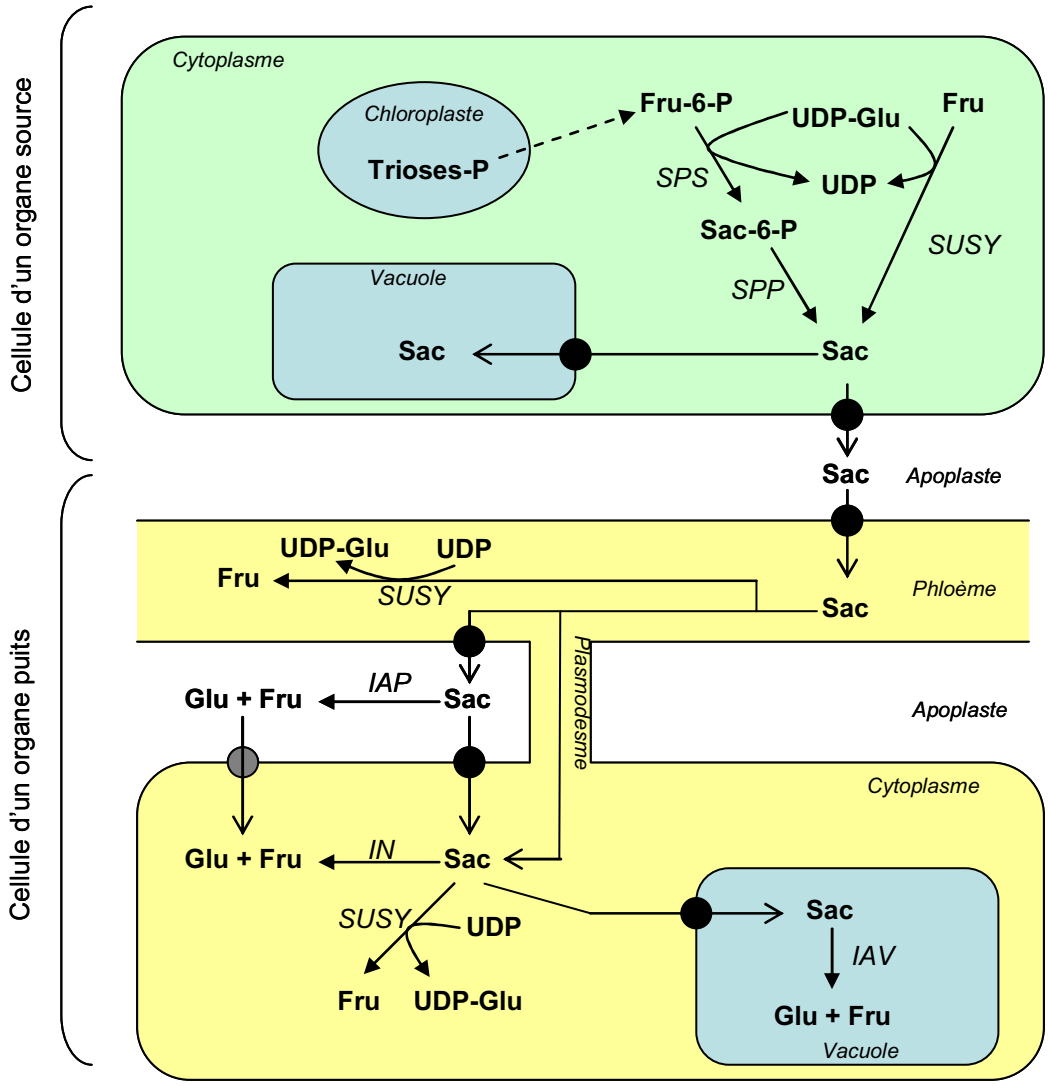


Figure 6 : *Voie de synthèse et de dégradation du saccharose (d'après Granot, 2008).*
Le saccharose (Sac) est formé dans les cellules des organes sources sous l'action combinée de deux enzymes : la sucrose phosphate synthase (SPS) et la sucrose phosphate phosphatase (SPP). La saccharose synthase (SUSY) peut également catalyser l'association de fructose et d'UDP-glucose pour produire du saccharose et de l'UDP. Le saccharose ainsi formé peut alors entrer dans les cellules des organes puits via les plasmodesmes ou à travers la paroi cellulaire. Il peut alors être hydrolysé par l'invertase acide pariétale (IAP), l'invertase neutre (IN), la saccharose synthase (SUSY) ou l'invertase acide vacuolaire (IAV). Glu : Glucose, UDP-Glu : UDP-Glucose, Fru : Fructose.

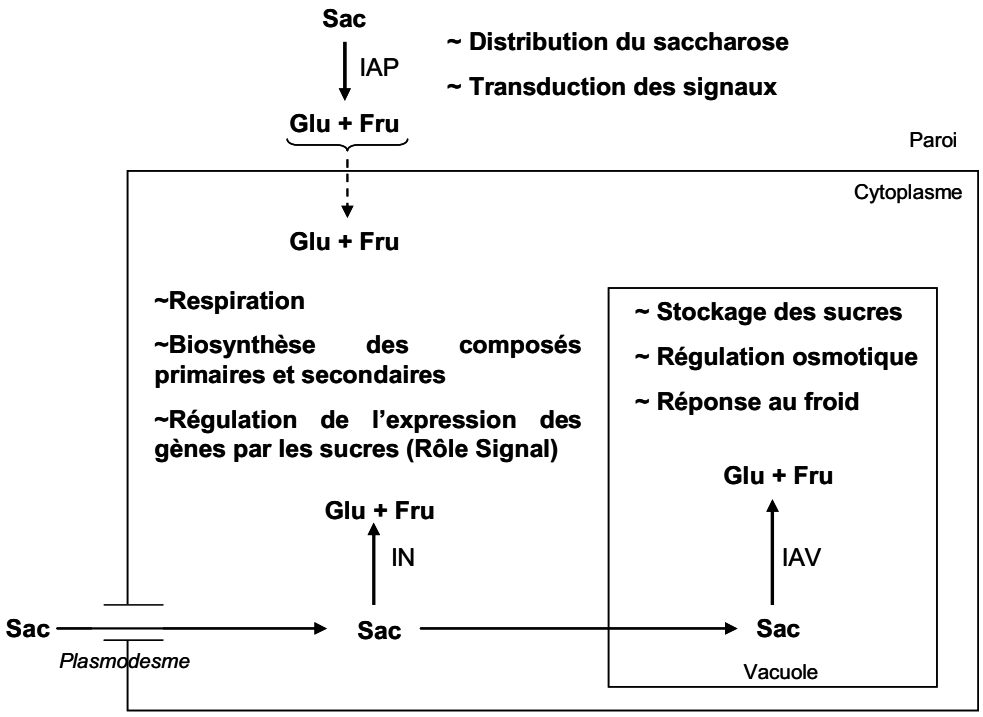


Figure 7 : *Localisation subcellulaire et rôles proposés des différentes invertases présentes chez les végétaux supérieurs (d'après Sturm & Tang, 1999).*
Les cellules végétales possèdent différentes isoformes d'invertases : l'invertase acide pariétale (IAP) au niveau de la paroi, l'invertase acide vacuolaire (IAP) dans la vacuole et l'invertase neutre (IN) dans le cytoplasme. Chacune de ces formes jouerait un rôle particulier dans la cellule. Sac : Saccharose, Glu : Glucose, UDP-Glu : UDP-Glucose, Fru : Fructose.

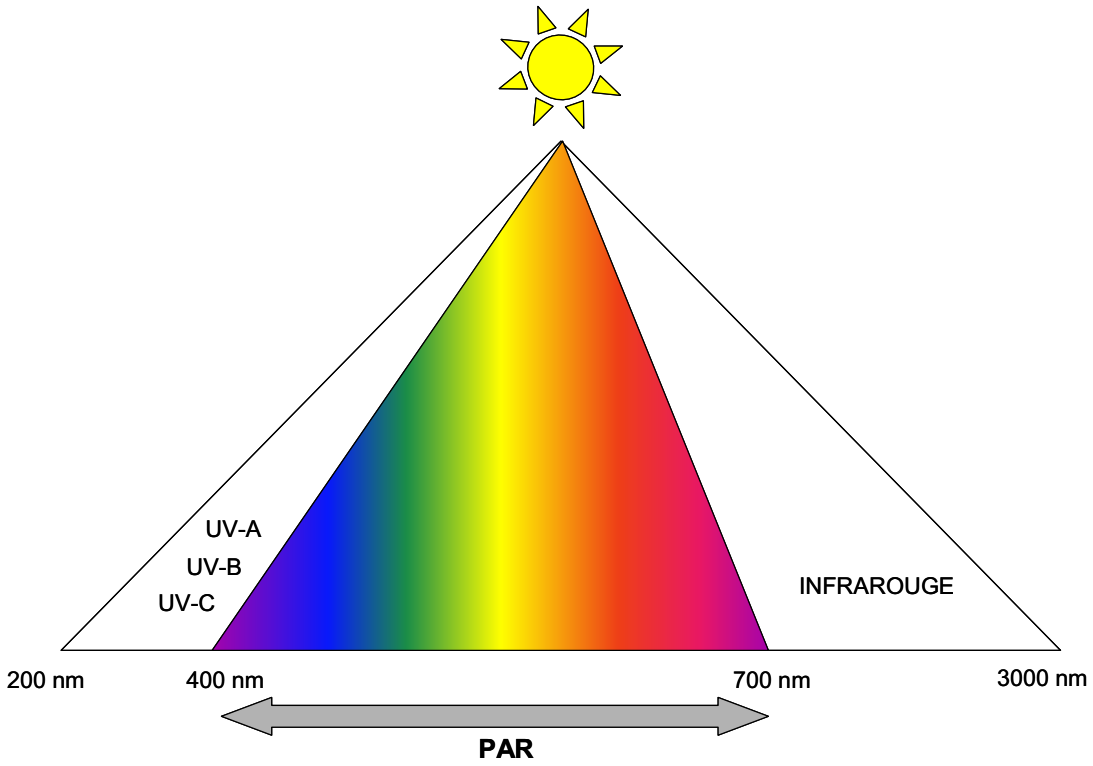


Figure 8 : *Représentation du spectre solaire parvenant à la Terre (d'après de Berranger et al., 2005).*
Le rayonnement solaire s'étend de 200 à 3000 nm. Il peut être divisé en trois parties : les radiations ultraviolettes (UV-A, B et C) pour les longueurs d'ondes inférieures à 400 nm, le rayonnement visible compris entre 400 et 700 nm, et les rayonnements infrarouges pour les longueurs d'ondes supérieures à 700 nm. Le rayonnement visible (entre 400 et 700 nm) est qualifié de rayonnement utile pour la photosynthèse (PAR, Photosynthetically Active Radiation).

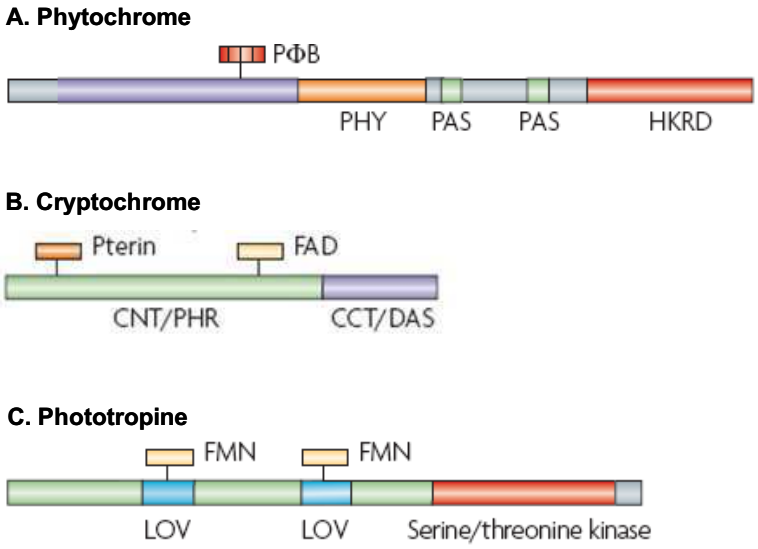
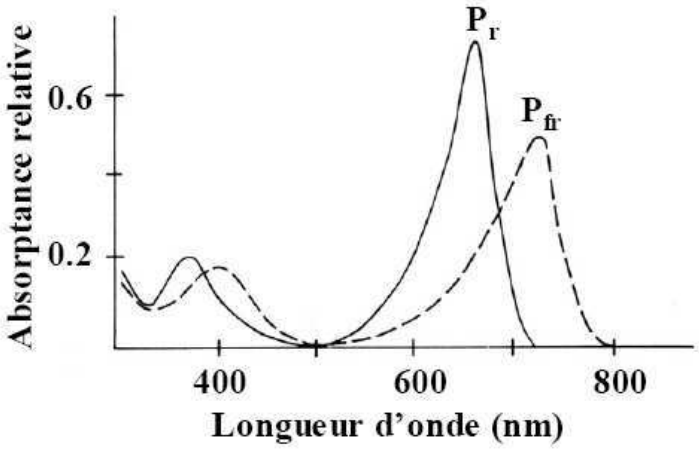


Figure 9 : *Représentation schématique de la structure des différents photorécepteurs (d'après Jiao et al., 2007).*

A. Les phytochromes sont des protéines dimériques. Chaque polypeptide est constitué d'un domaine N terminal qui se lie de façon covalente à un chromophore (de type biline, PΦB), suivi d'un domaine C terminal comprenant plusieurs motifs nécessaires à la dimérisation, à la localisation nucléaire et à la régulation de la voie de signalisation.
B. Les cryptochromes (CRY1 et CRY2 chez *Arabidopsis thaliana*) sont formés de deux domaines. Le domaine N terminal ou domaine PHR permet la liaison de deux chromophores (une flavine adénine dinucléotide, ou FAD, et une ptérine). Le domaine C terminal, dont la taille varie selon le cryptochrome, serait impliqué dans la voie de signalisation.
C. Les phototropines présentent une extrémité N terminale, sensible à la lumière de par la présence de deux domaines LOV permettant la fixation de deux chromophores (FMN), et une extrémité C terminale présentant une activité sérine/thréonine kinase.

A



B

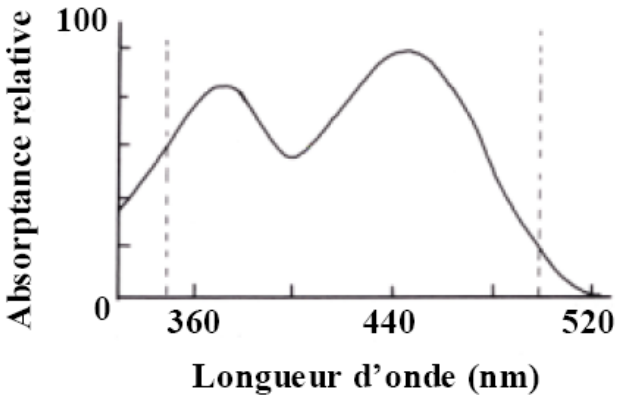


Figure 10 : *Spectres d'absorption des formes Pr et Pfr du phytochrome et de la flavine.*

A. Spectres d'absorptions relatifs basés sur les valeurs moyennes de coefficients d'extinction molaire du phytochrome purifié à partir de plantules étiolées d'avoine et de seigle (d'après Kendrick & Kronenberg, 1994).
B. Spectre d'absorption de la flavine (d'après Mohr & Shropshire, 1983). L'absorption dépend de la longueur d'onde dans l'UV-A/bleu (320-520 nm) avec un pic d'absorption autour de 370 nm et un autour de 450 nm.

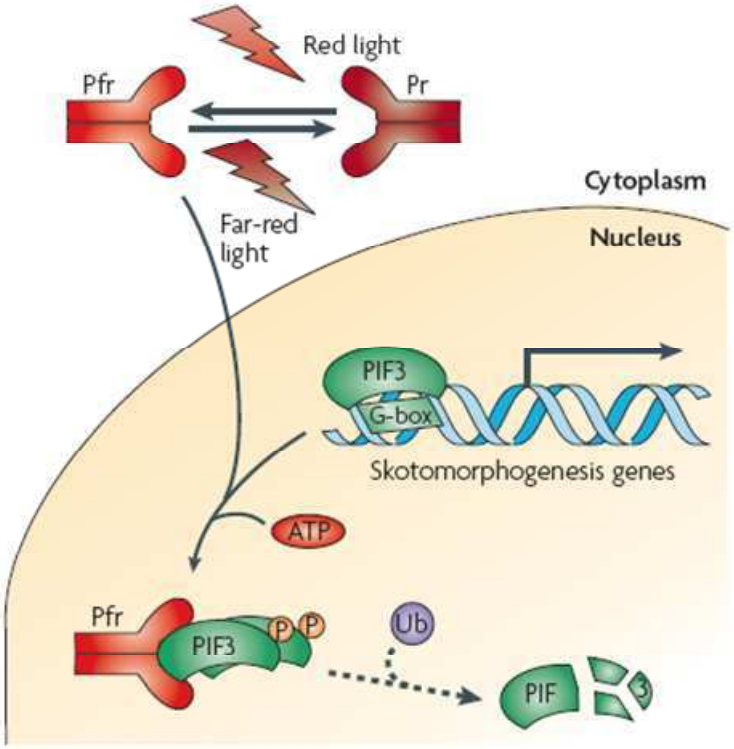


Figure 11 : *Mécanisme de régulation du facteur de transcription PIF3 par la lumière (d'après Jiao et al., 2007).*
Le facteur de transcription PIF3 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3) induit l'expression de gènes liés à la skotomorphogenèse (développement à l'obscurité). La lumière rouge clair permet la transformation de la forme Pr du phytochrome en forme Pfr. Cette dernière est transportée dans le noyau de la cellule où elle peut interagir avec PIF3, ce qui inhibe l'expression des gènes liés à la skotomorphogenèse. PIF3 est ensuite rapidement phosphorylé et ubiquitinylé, ce qui entraîne sa dégradation.

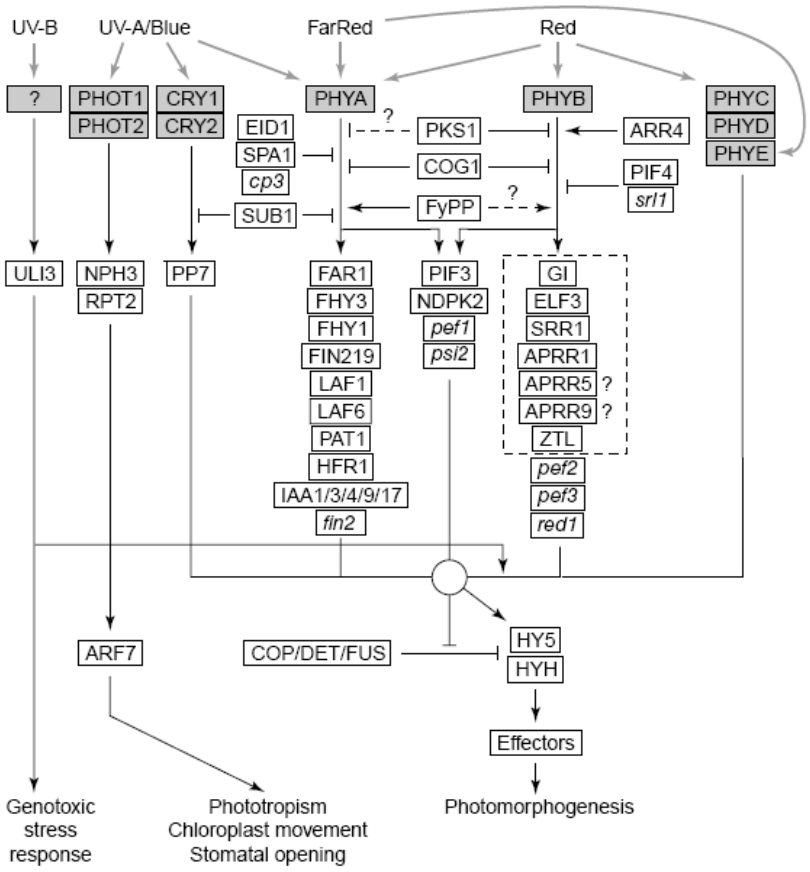


Figure 12 : *Photorécepteurs et intermédiaires potentiels de la voie de transduction du signal lumineux (d'après Gyula et al., 2003).*

Tableau II : *Tableau récapitulatif de l'influence de l'intensité et de la qualité lumineuse sur l'architecture et ses composantes chez plusieurs espèces.*

Conditions de lumière		***Processus physiologique***	***Effet***	***Espèce***	***Références bibliographiques***
Intensité lumineuse	Forte	Ramification	+	*Vaccinium bracteatum*	Kawamura & Takeda, 2002
				Vaccinium hirtum	Kawamura & Takeda, 2004
				Abies balsamea L.	
				Picea abies L.	Niinemets & Lukjanova, 2003
				Pinus sylvestris	
				Litsea acuminata	Takenaka, 2000
		Débourrement	+	*Rosa hybrida* L.	Khayat & Zieslin, 1982 ; Bredmose, 1997
		Vitesse de croissance des tiges	+	*Rosa hybrida* L.	Bredmose, 1998
		Longueur des tiges	-	*Rosa hybrida* L.	Bredmose, 1998
	Faible	Ramification	-	*Fraxinus pennsylvanica*	Bartlett & Remphrey, 1998
		Débourrement	-	*Triticum aestivum*	Evers *et al.* , 2006
			-	*Lolium perenne L.*	Bahmani *et al.* , 2000
		Longueur des tiges	-	*Fraxinus pennsylvanica*	Bartlett & Remphrey, 1998
Qualité lumineuse	Rc/Rs élevé	Débourrement	+	*Disanthus cercidifolius*	
			+	*Crateagus oxyacantha*	Marks & Simpson, 1999
			+	rhododendrons	
			+	*Rosa hybrida* L.	Mor *et al.* , 1980 ; Zieslin & Mor, 1990
			-	*Prunus cerasifera*	Muleo *et al.* , 2001
		Vitesse de croissance des tiges	+	*Rosa hybrida* L.	Mor *et al.* , 1980
	Rc/Rs faible	Ramification	-	*Lolium multiflorum*	Casal *et al.* , 1985, 1986
			-	*Paspalum dilatatum*	
			-	*Hordeum vulgare*	Skinner & Simmons, 1993
			-	*Eragrostris curvula*	Wan & Sosebee, 1998
		Débourrement	-	*Rosa hybrida* L.	Healy & Wilkins, 1980 ; Mor *et al.* , 1980 ; Zieslin & Mor, 1990
	Bleu	Débourrement	+	*Triticum aestivum*	Barnes & Bugbee, 1992
			+	*Prunus cerasifera*	Muleo *et al.* , 2001
			-	*Malus domestica*	Muleo & Morini, 2006, 2008
		Croissance des tiges	-	*Picea abies* L.	Molmann *et al.* , 2006
			-	*Malus domestica*	Muleo & Morini, 2006, 2008

Rosa hybrida ‘Radrazz’

Rosa hybrida ‘Meiratcan’

Rosa hybrida ‘Meichibon’

Rosa hybrida ‘Meiprille’

Rosa chinensis ‘Old blush’

Rosa wichurana ‘Basye’s thornless’

Figure 13 : *Photographies des six variétés de rosiers étudiées.*

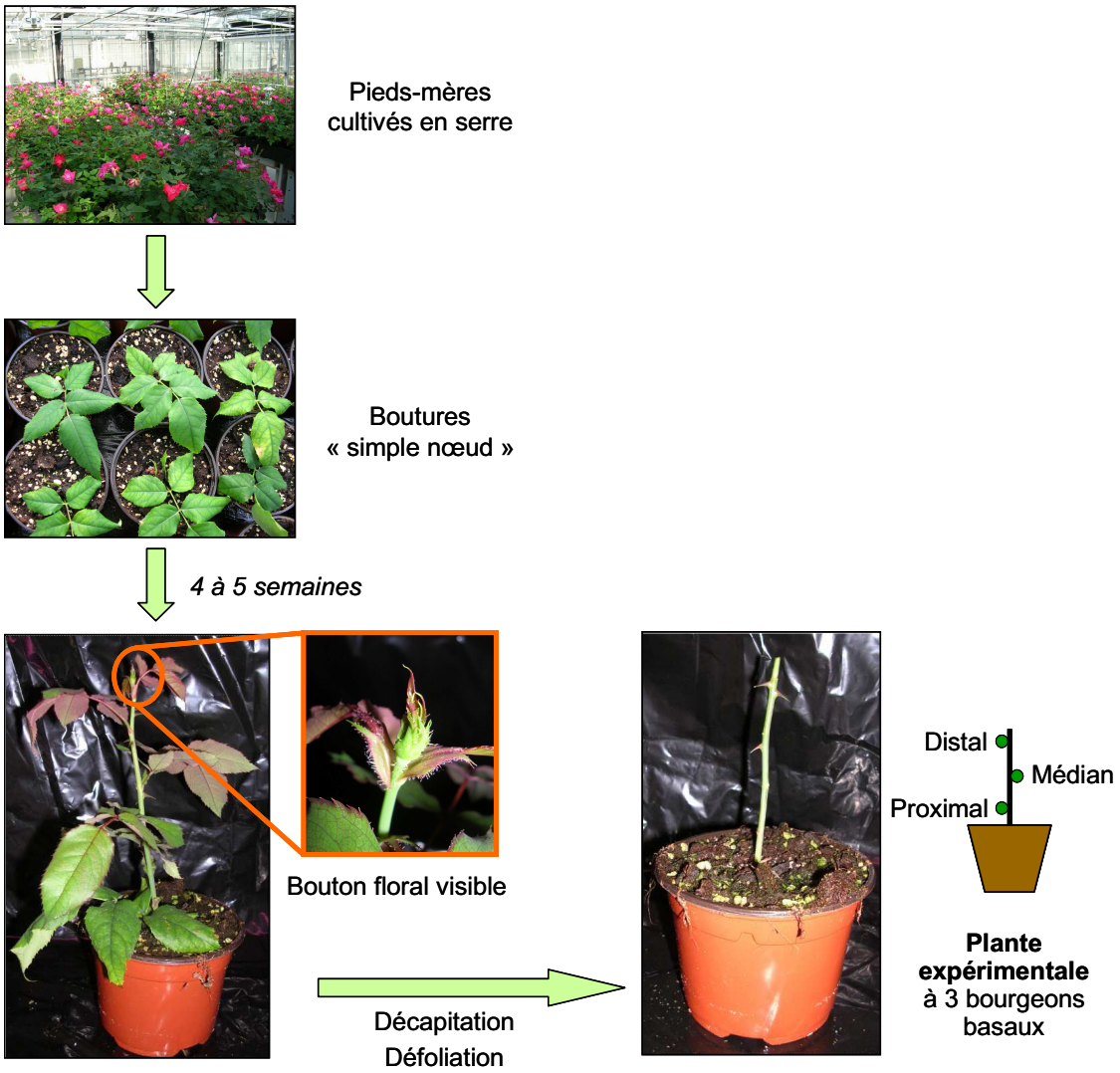


Figure 14 : *Schématisation du mode d'obtention de la plante expérimentale chez Rosa hybrida 'Radrazz'.*

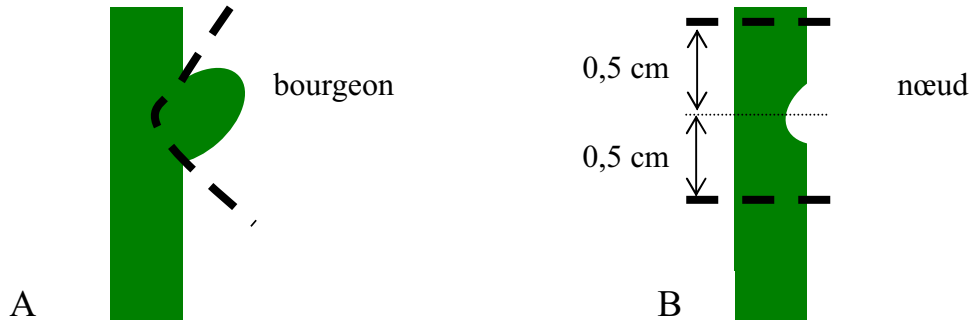


Figure 15 : *Zone de prélèvement du matériel végétal.*
A. Zone de prélèvement du bourgeon. B. Zone de prélèvement du nœud : environ 0,5 cm de part et d'autre de l'emplacement du bourgeon.

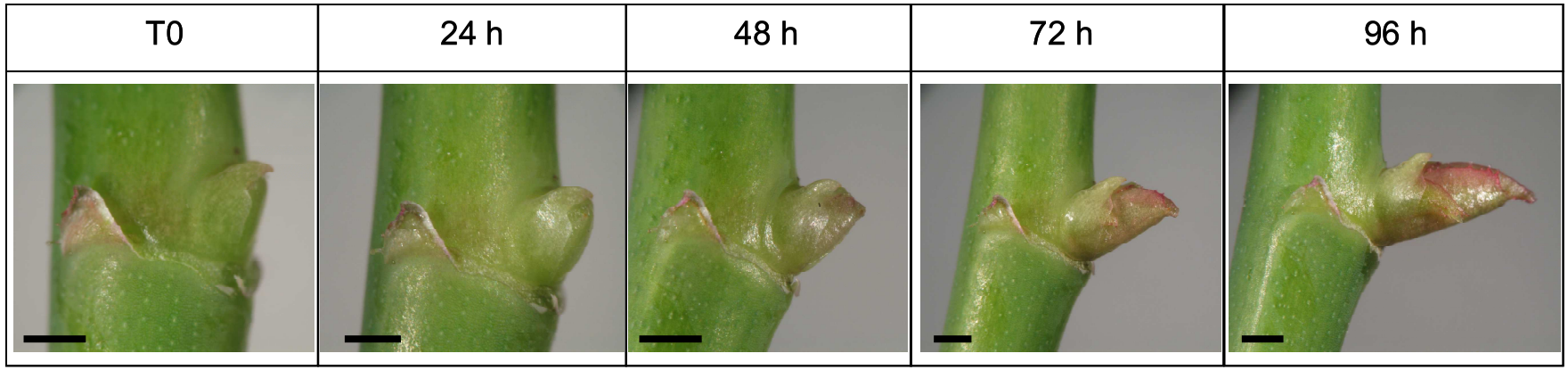


Figure 16 : *Observation du débourrement du bourgeon distal de Rosa hybrida 'Radrazz' après décapitation.*
Les plantes expérimentales sont placées sous lumière blanche (200 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h) juste après décapitation (T0) pendant 24 à 96 h. Barre d'échelle = 1 mm.

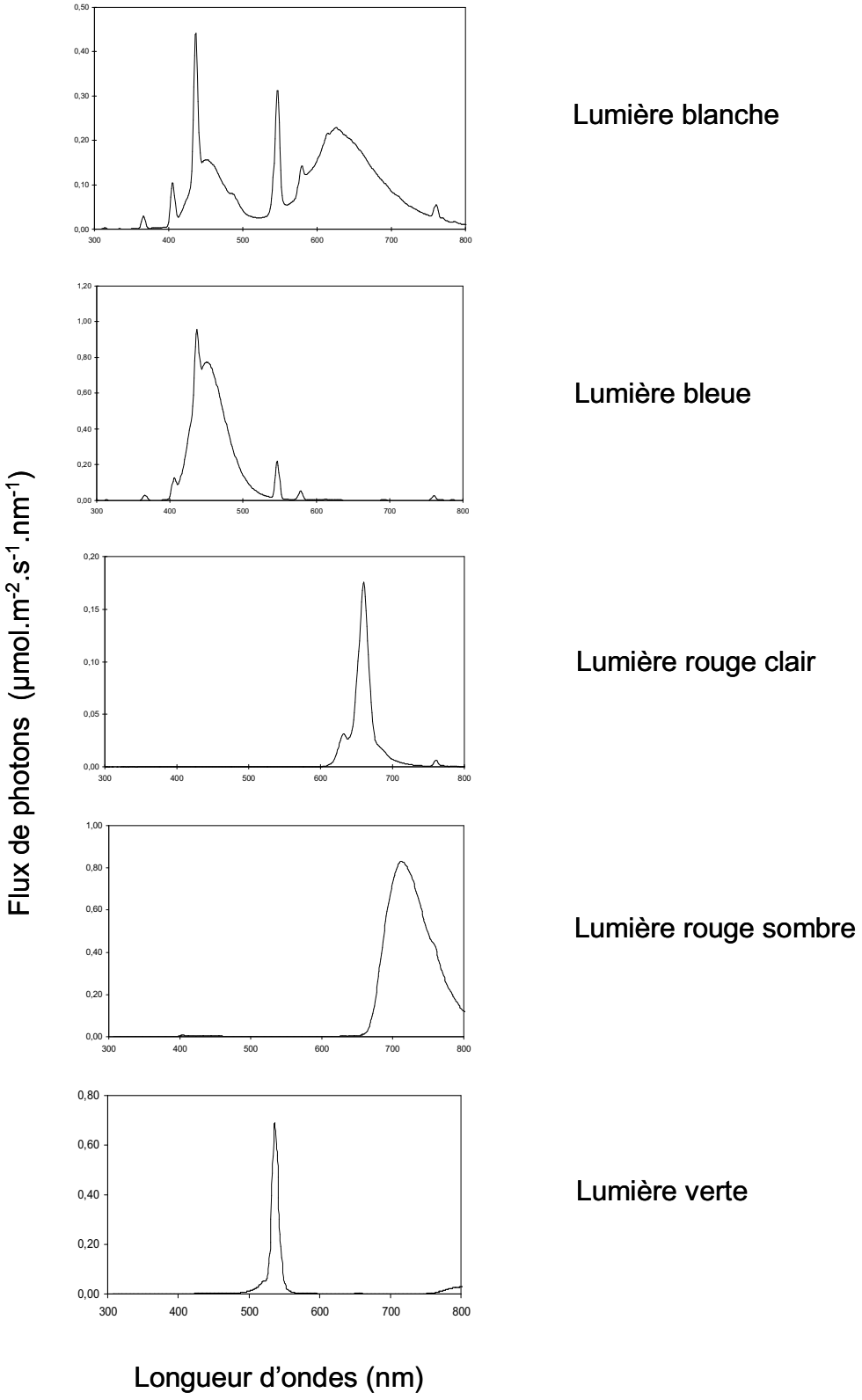


Figure 17 : *Spectres d'émission des lumières blanche, bleue, rouge clair, rouge sombre et verte utilisées lors des différentes expérimentations.*

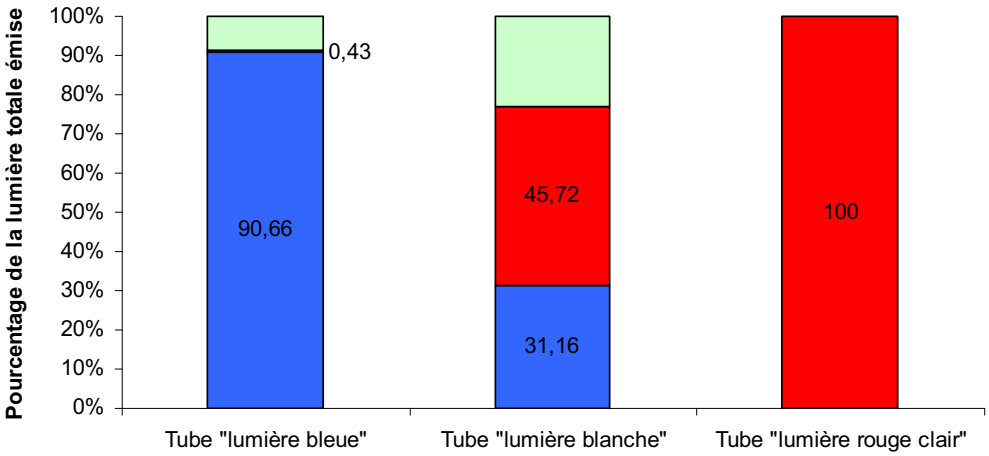


Figure 18 : *Composition (en pourcentage) des différentes qualités lumineuses émises (lumière blanche, bleue et rouge clair) entre 400 et 700 nm.*
Le spectre lumineux mesuré entre 400 et 700 nm a été séparé en 3 classes : 400 – 500 nm lumière bleue, 500 – 600 nm lumière verte, 600 – 700 nm lumière rouge clair. Le pourcentage de chaque qualité lumineuse émise pour un tube fluorescent donné est noté sur le graphique.

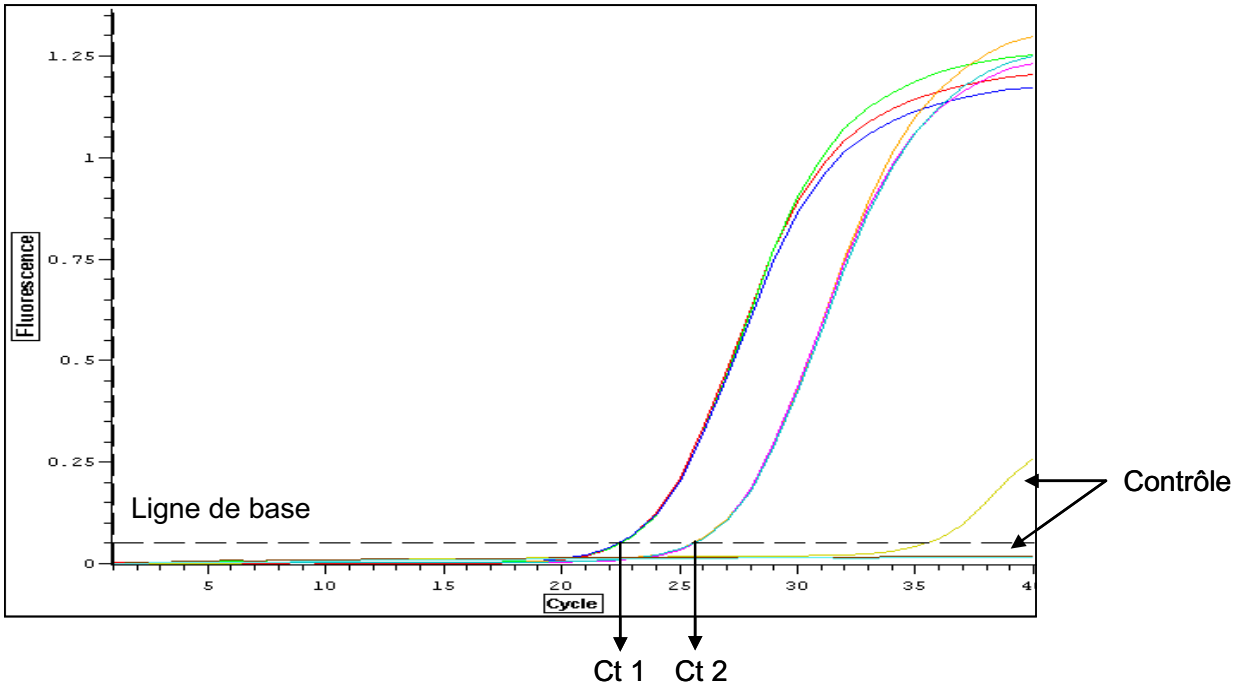


Figure 19 : *Courbes d'amplifications d'un gène d'intérêt à partir d'échantillons d'ADNc différents.*
La fluorescence (unités arbitraires) des puits au cours de la PCR est représentée en fonction du nombre de cycles. Chaque faisceau regroupe 3 courbes correspondant à 3 amplifications réalisées avec la même quantité initiale d'ADNc. La ligne de base, symbolisée par une ligne horizontale en pointillés, permet de définir le cycle-seuil (Ct) de chaque courbe. La fluorescence du contrôle sans ADNc, indiquée par une flèche, reste inférieure à la ligne de base ou augmente tardivement, pour un nombre de cycles élevé.

Tableau III : *Souche d'Escherichia coli.*

Souche	*Génotype*	*Résistance aux antibiotiques*
JM109	*end*A1, *rec*A1, *gyr*A96, *thi*, *hsd*R17 (r_k-, m_k+), *rel*A1, *sup*E44, Δ (*lac* – *pro*AB), [F' *tra*D36, *pro*AB, *laq*I^qZΔM15]	Ampicilline

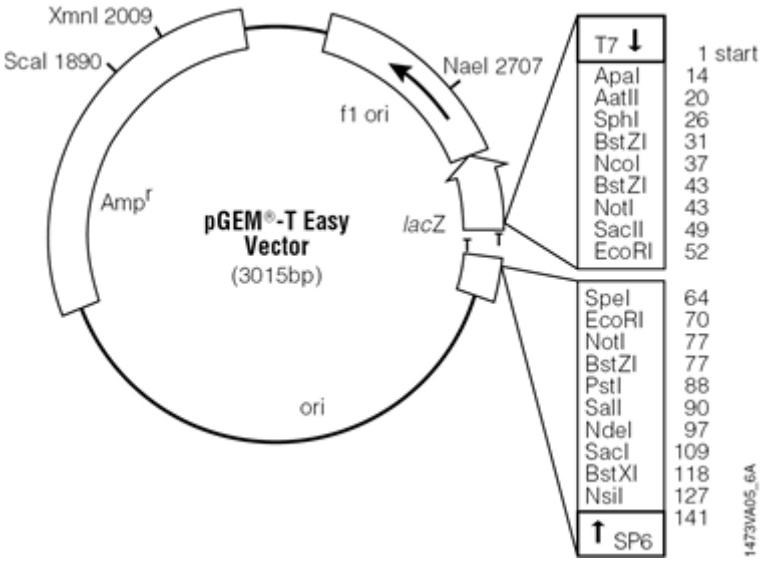


Figure 20 : *Carte du vecteur de clonage pGEM-T® easy (Promega).*

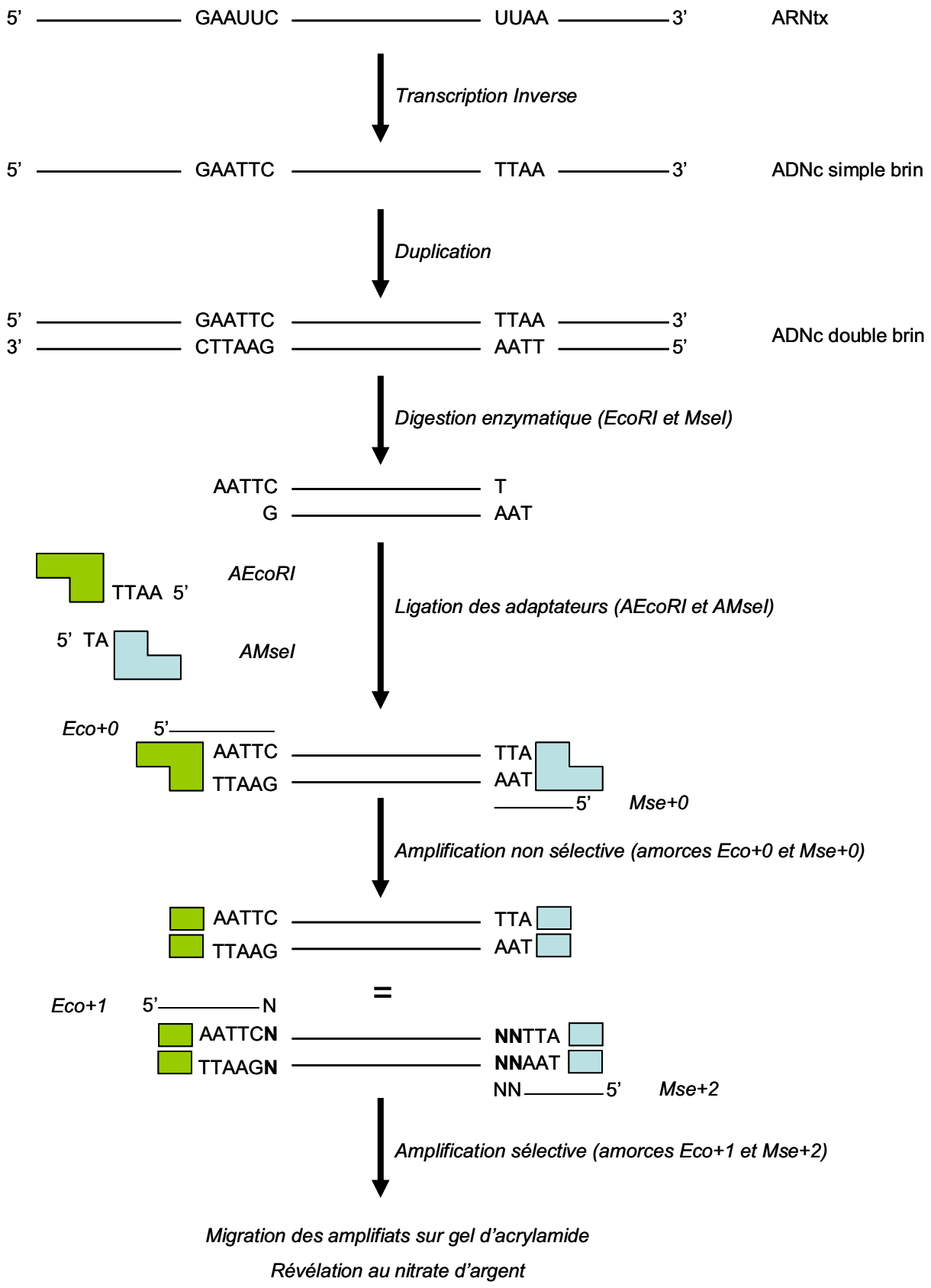


Figure 21 : *Détails de la procédure cDNA-AFLP.*

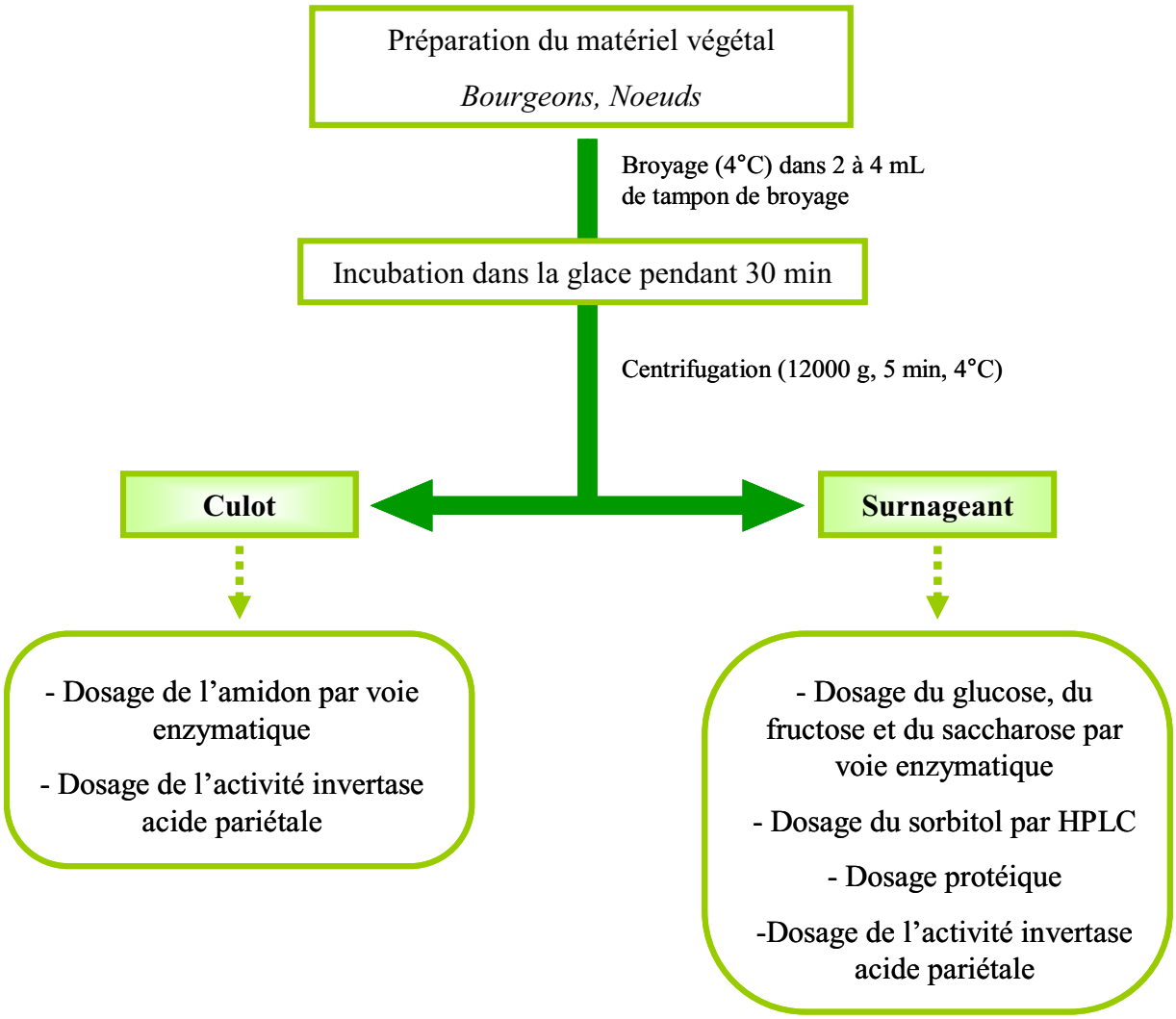


Figure 22 : *Protocole d'extraction des sucres solubles, de l'amidon et des enzymes invertases acides vacuolaire et pariétale.*
La composition des solutions est donnée dans le texte.

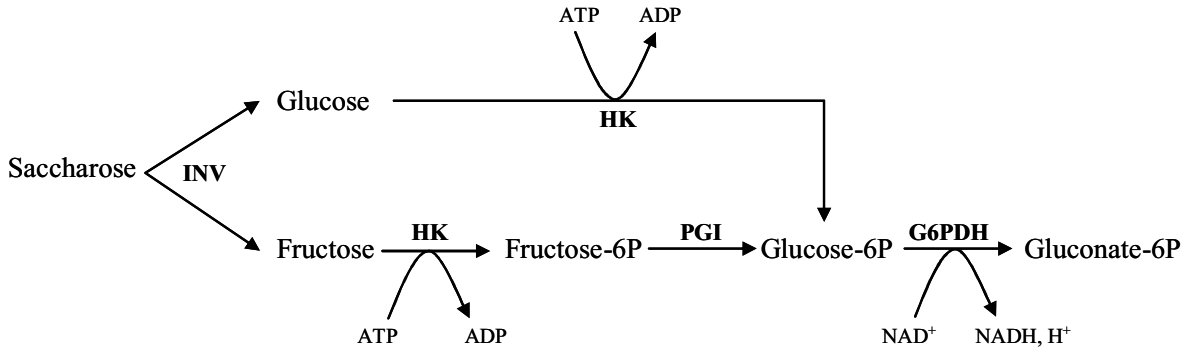


Figure 23 : *Schéma représentant les réactions couplées impliquées dans les dosages des sucres solubles et dans les mesures d'activités enzymatiques.*
INV: INVertase (EC 3.2.1.26), HK: HexoKinase (EC 2.7.1.1), PGI: PhosphoGlucoIsomérase (EC 5.3.1.9), G6PDH: Glucose-6-Phosphate DésHydrogénase (EC 1.1.1.49).

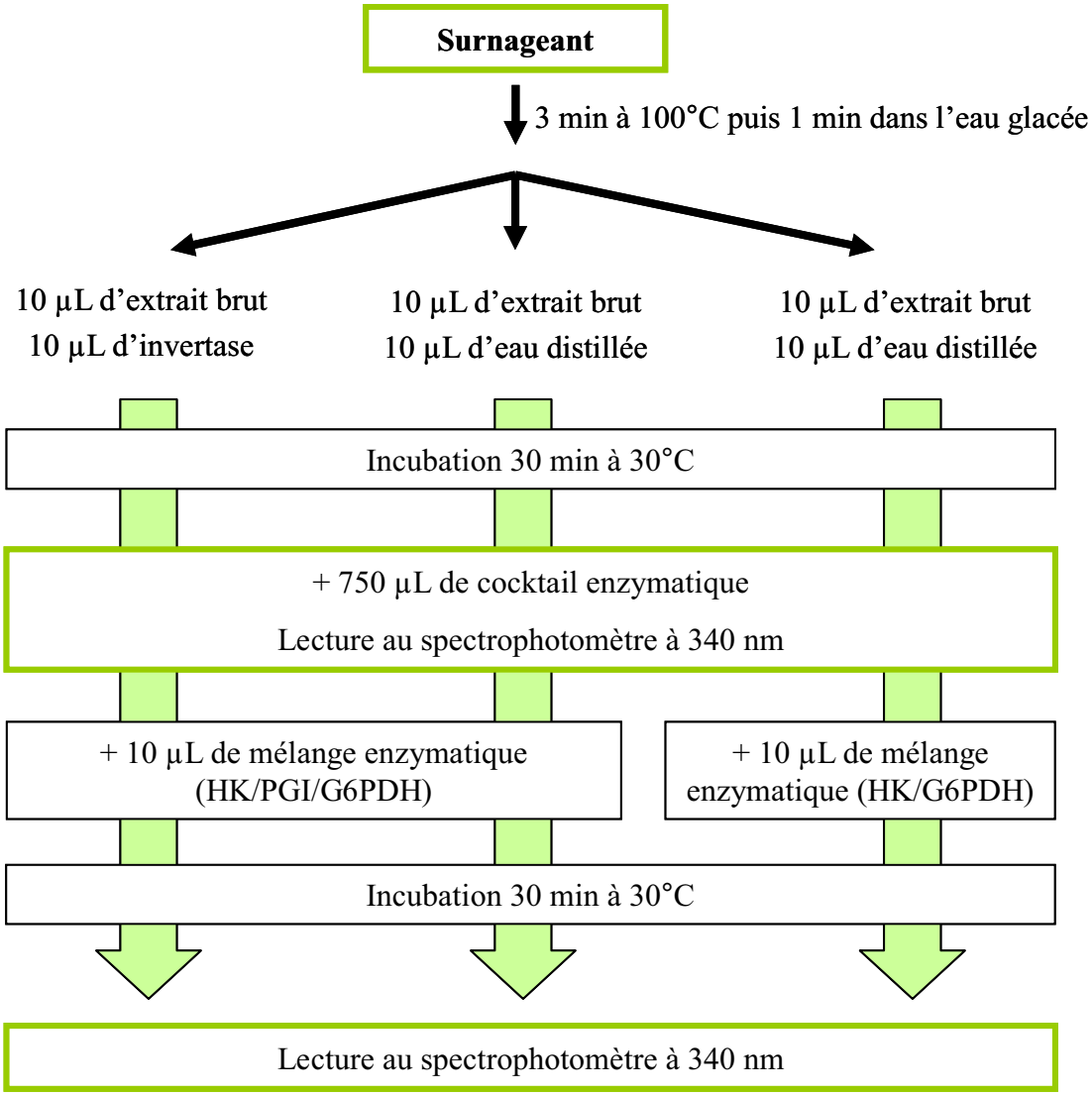


Figure 24 : *Protocole de dosage du glucose, du fructose et du saccharose.*
La composition des solutions est donnée dans le texte.

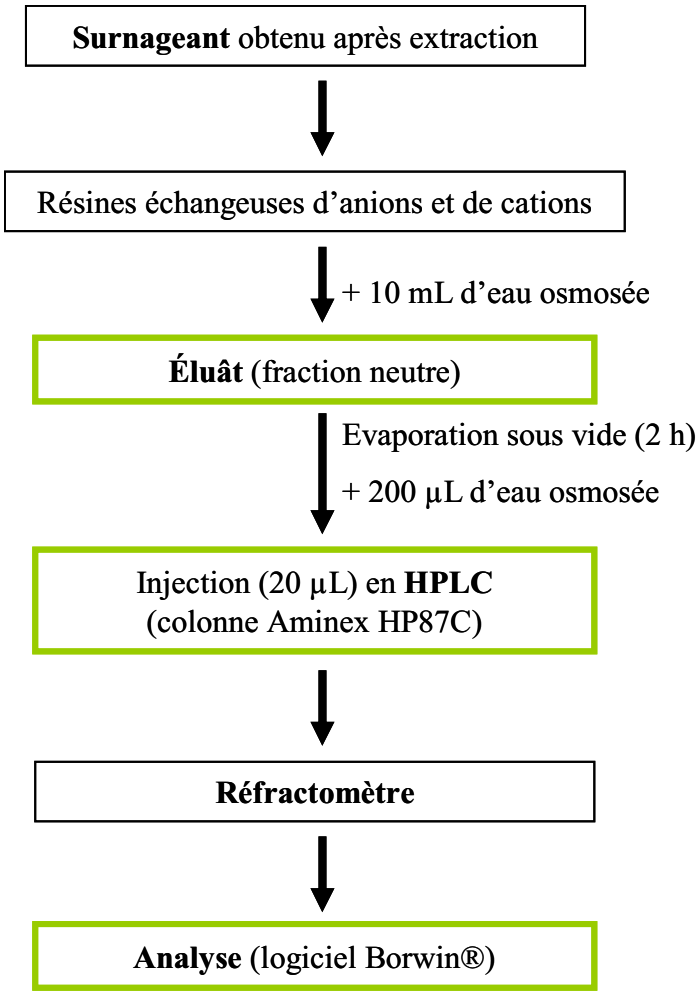


Figure 25 : *Protocole de préparation des échantillons et de dosage du sorbitol par HPLC.*

Tableau IV : *Temps de rétention de différents sucres sur la colonne Aminex HP87C.*

Sucre	Temps de rétention (min)
Saccharose	9,82
Glucose	12,14
Fructose	15,73
Sorbitol	25,83

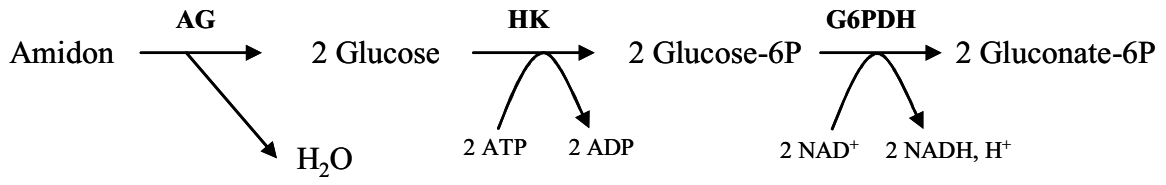


Figure 26 : *Schéma représentant les réactions couplées impliquées dans le dosage de l'amidon.*
AG: AmyloGlucosidase (EC 3.2.1.3), HK: HexoKinase (EC 2.7.1.1), G6PDH: Glucose-6-Phosphate DésHydrogénase (EC 1.1.1.49).

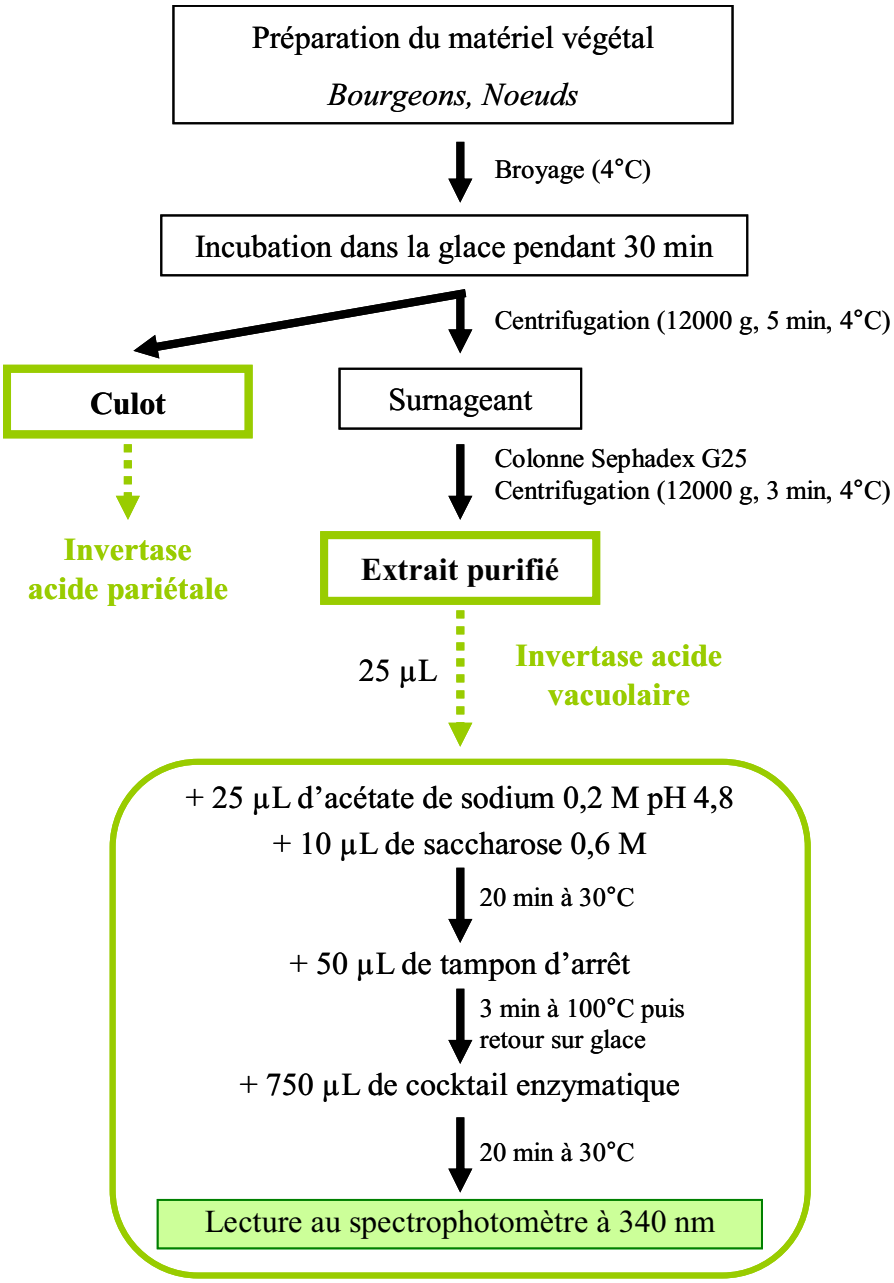


Figure 27 : *Protocole d'extraction et de mesure des activités invertases acides pariétale et vacuolaire.*
La composition des solutions est donnée dans le texte.

$$\text{D-sorbitol} + NAD^+ \xleftrightarrow{\textbf{NAD-SDH}} \text{D-fructose} + NADH, H^+$$

Figure 28 : *Schéma représentant la réaction réalisée par la sorbitol déshydrogénase NAD-dépendante (NAD-SDH).*

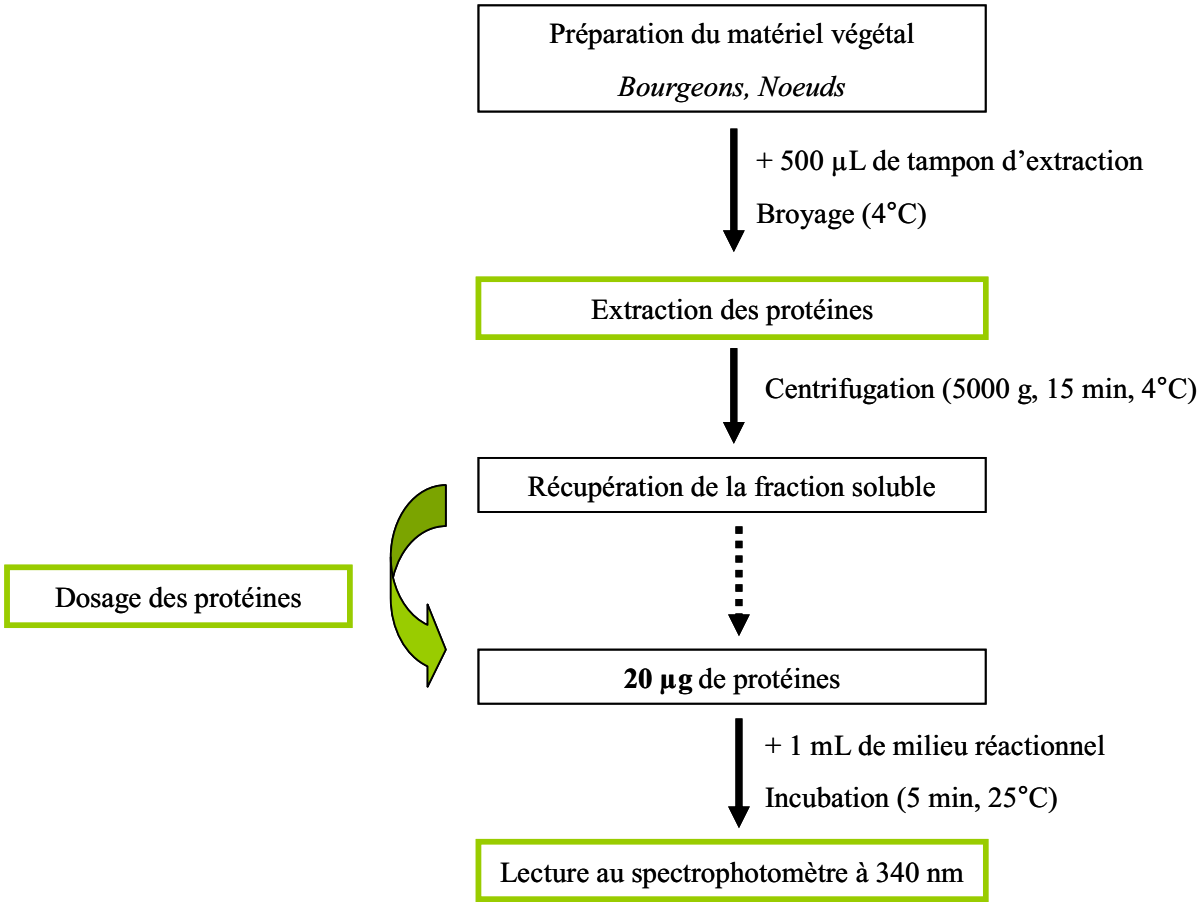


Figure 29 : *Protocole de dosage de l'activité NAD-SDH* (d'après Lo Bianco *et al.,* 1998*).*
La composition des solutions est donnée dans le texte.

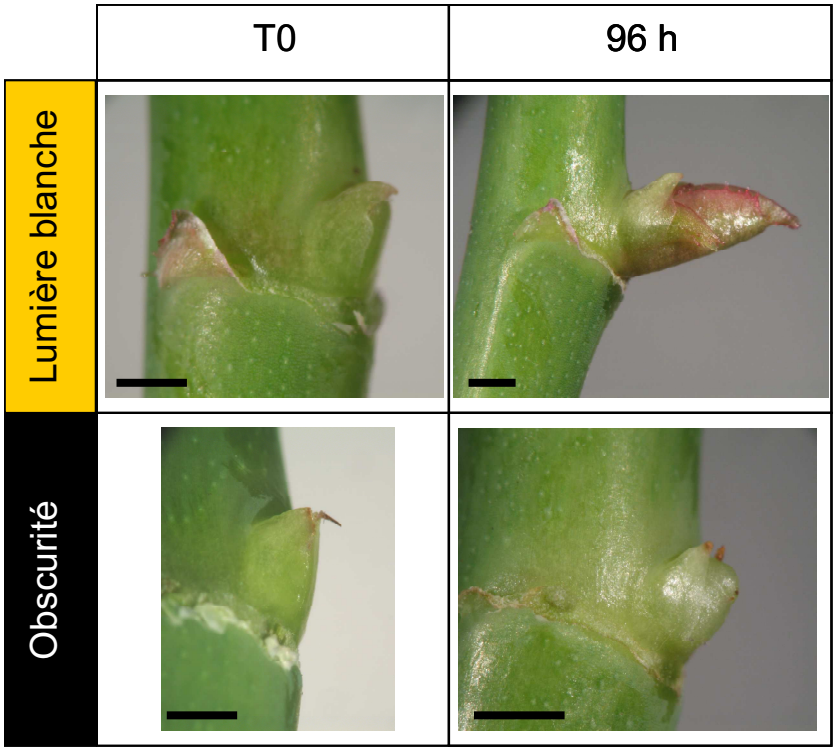


Figure 30 : *Observation du débourrement du bourgeon distal de Rosa hybrida 'Radrazz' après décapitation.*
Les plantes expérimentales sont placées soit sous lumière blanche (200 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h) soit à l'obscurité, juste après décapitation (T0) et pendant 96 h. Barre d'échelle = 1 mm.

	Lumière blanche (16h/24h)	**Obscurité** (24h/24h)
Rosa hybrida 'Radrazz'		
Populus tremula x Populus tremuloïdes		
Solanum lycopersicum 'Tresor' hybrid F1		
Arabidopsis thaliana		

Figure 31 : *Débourrement des bourgeons axillaires de plantes appartenant à quatre genres différents après 12 jours de culture sous lumière blanche ou à l'obscurité.*
Les flèches indiquent les jeunes tiges en croissance, n = 10 plantes minimum.

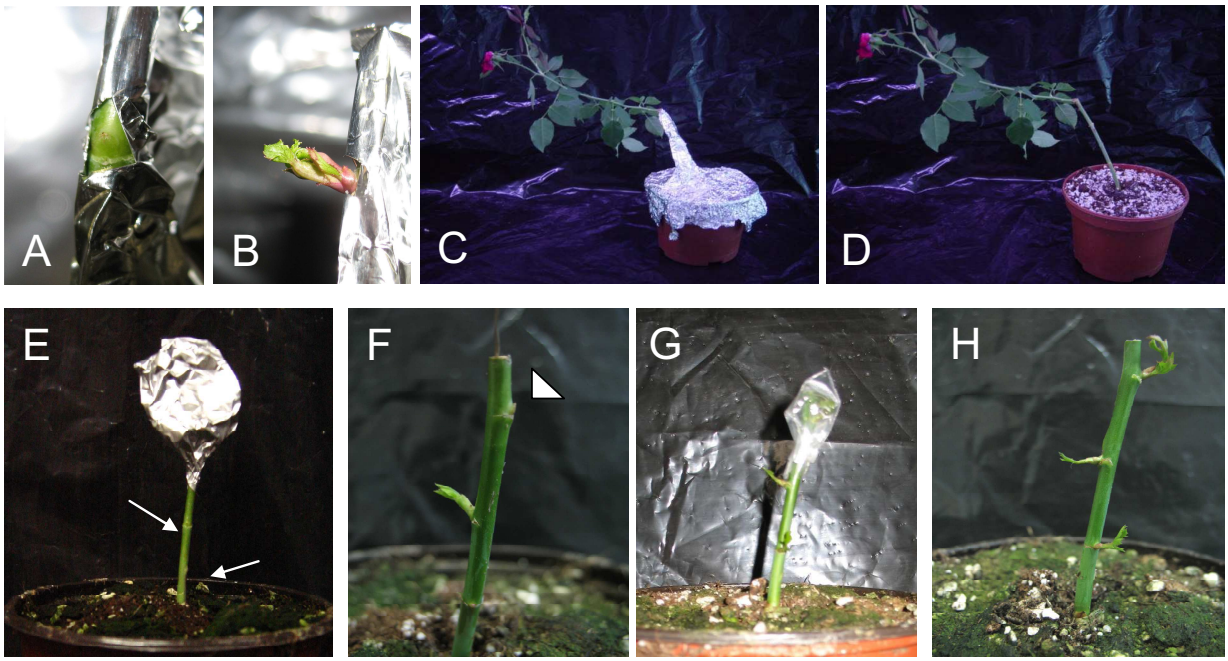


Figure 32 : *Effet d'une mise à l'obscurité partielle de la plante expérimentale* *Rosa hybrida* *'Radrazz' sur le débourrement des bourgeons distaux.*
A) Juste après décapitation, la tige est placée à l'obscurité (recouverte de papier aluminium) à l'exception du bourgeon distal. B) 7 jours après A), le bourgeon exposé à la lumière blanche a débourré. C) Un mois après A), une tige s'est formée, portant une fleur à son extrémité. D) Au même moment que C), le papier aluminium est retiré et les bourgeons qui étaient à l'obscurité n'ont pas débourré. E) Juste après la décapitation, le bourgeon distal est masqué par du papier aluminium, le reste de la tige et les bourgeons médian et proximal (flèches) sont exposés à la lumière blanche. F) 7 jours après E), le papier aluminium est enlevé : le bourgeon distal n'a pas débourré (tête de flèche) contrairement au bourgeon médian. Le bourgeon proximal présente un gonflement. G,H) Contrôle expérimental réalisé de la même façon que E) avec du film plastique transparent. Sous cette condition, le débourrement des 3 bourgeons est observé 7 jours après décapitation.

Tableau V : *Pourcentages de débourrement des bourgeons distaux et médians des plantes expérimentales appartenant à six variétés de rosier, cultivées pendant 12 jours sous la lumière blanche où à l'obscurité.*

Traitement lumineux		**Lumière blanche (200 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h)**			**Obscurité (24h/24h)**		
Espèce	**Variété**	**Nombre de plantes**	**Nombre de plantes ayant le bourgeon distal débourré**	**Nombre de plantes ayant le bourgeon médian débourré**	**Nombre de plantes**	**Nombre de plantes ayant le bourgeon distal débourré**	**Nombre de plantes ayant le bourgeon médian débourré**
Rosa hybrida	'Radrazz'	20	20	20	19	0	0
	'Meiprille'	19	19	19	28	0	0
	'Meiratcan'	18	18	18	34	0	0
	'Meichibon'	19	19	19	9	0	0
Rosa chinensis	'Old blush'	20	20	19	9	0	0
Rosa wichurana	'Basye's thornless'	17	17	17	30	0	0

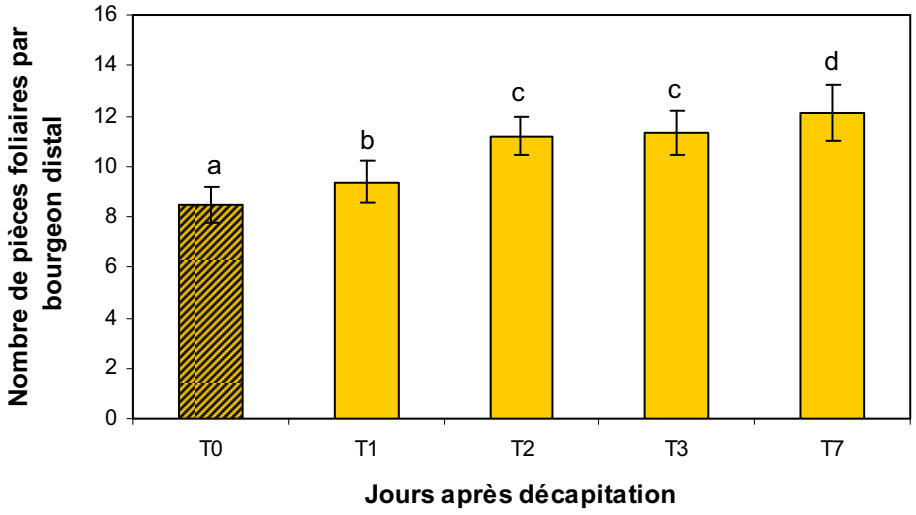


Figure 33 : *Nombre moyen de pièces foliaires (jeunes feuilles, primordia et écailles) par bourgeon distal de Rosa hybrida 'Radrazz' juste après décapitation (T0) et après 1, 2, 3 ou 7 jours en présence de lumière blanche (200 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h).*
Chaque valeur représente la moyenne ± erreur standard, avec n = 13 à 20 plantes. Les différentes lettres indiquent les différences significatives ($p<0,05$).

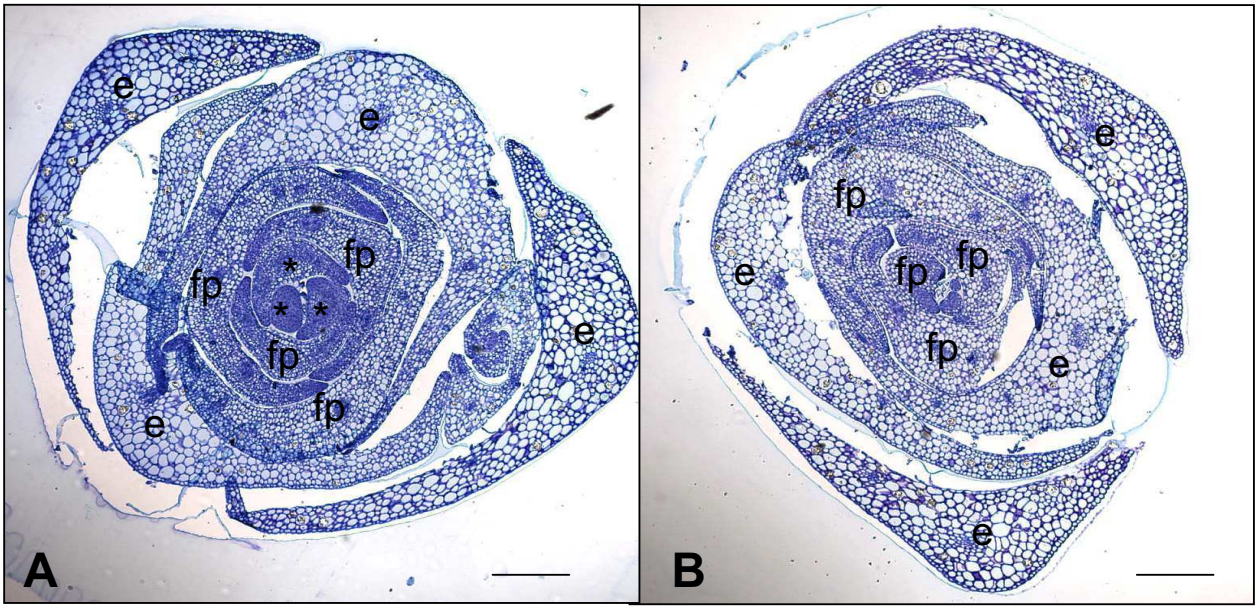


Figure 34 : *Coupes transversales de bourgeons distaux de plantes expérimentales* *<u>Rosa hybrida</u>* *'Radrazz' cultivées pendant 3 jours A) sous lumière blanche (200 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h) ou B) à l'obscurité.*

L'accumulation de nouveaux primordia est observée (*) à la lumière (A) mais pas à l'obscurité (B), où le nombre de pièces foliaires par bourgeon distal (8) est identique à celui trouvé juste après décapitation. e : écailles ; fp : feuilles préformées. Barre d'échelle = 250 µm.

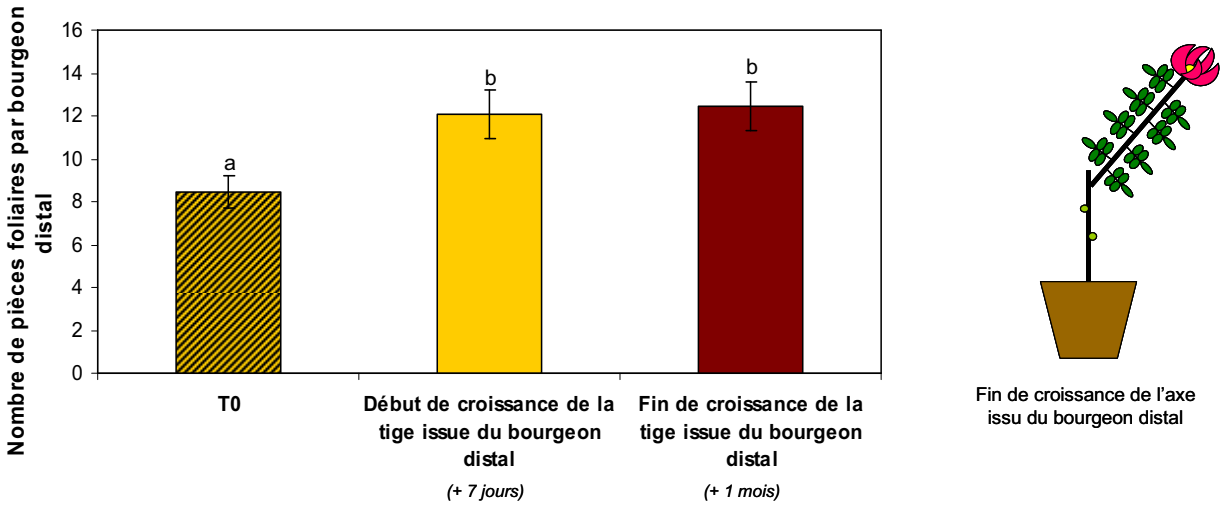


Figure 35 : *Nombre moyen de pièces foliaires (jeunes feuilles, primordia et écailles) par bourgeon distal de Rosa hybrida 'Radrazz' juste après décapitation (T0) et au cours du débourrement (7 jours et 1 mois après décapitation) en présence de lumière blanche (200 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h).*

Chaque valeur représente la moyenne ± erreur standard, avec n = 15 à 20 plantes. Les différentes lettres indiquent les différences significatives ($p<0,05$).

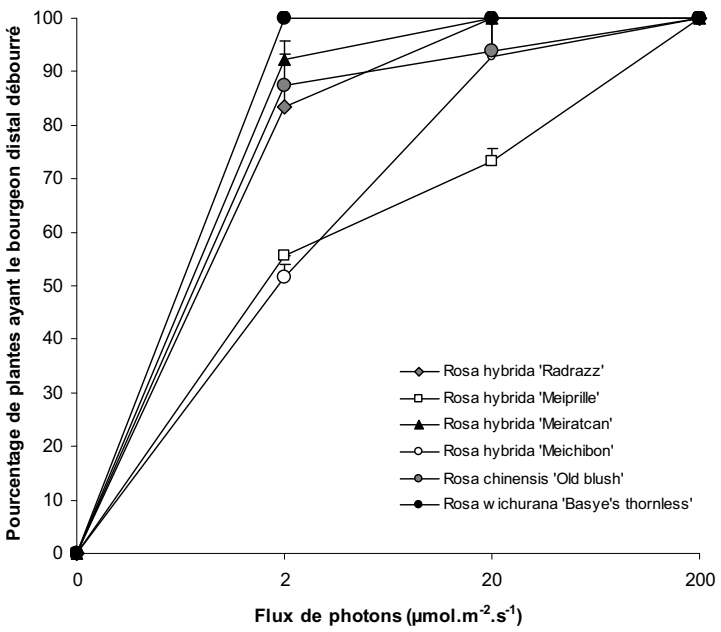


Figure 36 : *Pourcentages de plantes expérimentales présentant un bourgeon distal débourré après 12 jours de culture sous des valeurs croissantes de flux de photons (lumière blanche).*
Chaque valeur représente la moyenne ± erreur standard de 2 répétitions biologiques, n = de 6 à 40 plantes.

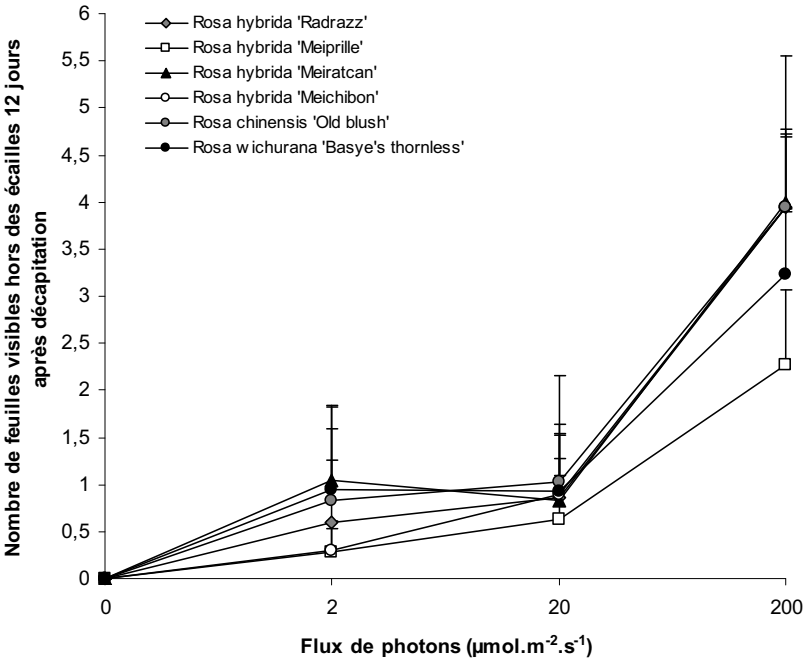


Figure 37 : *Nombre moyen de feuilles visibles hors des écailles des bourgeons distaux des plantes expérimentales après 12 jours de culture sous des valeurs croissantes de flux de photons (lumière blanche).*
Chaque valeur représente la moyenne ± erreur standard de 2 répétitions biologiques, n = de 6 à 40 plantes.

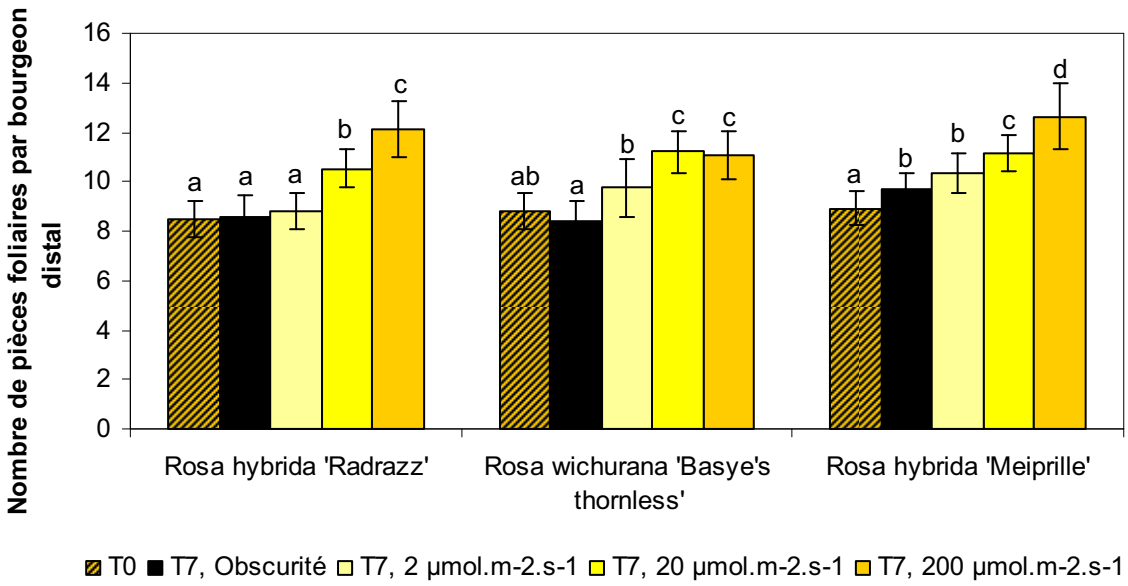


Figure 38 : *Nombre moyen de pièces foliaires (primordia, jeune feuilles et écailles) par bourgeon distal juste après décapitation (T0) et après 7 jours de culture sous des valeurs croissantes de flux de photons (obscurité, 2, 20 et 200 µmol.m^{-2}.s^{-1}, lumière blanche), chez 3 variétés de rosier.*
Chaque valeur représente la moyenne ± erreur standard, avec n = 10 plantes minimum. Les différentes lettres indiquent les différences significatives (p<0,05).

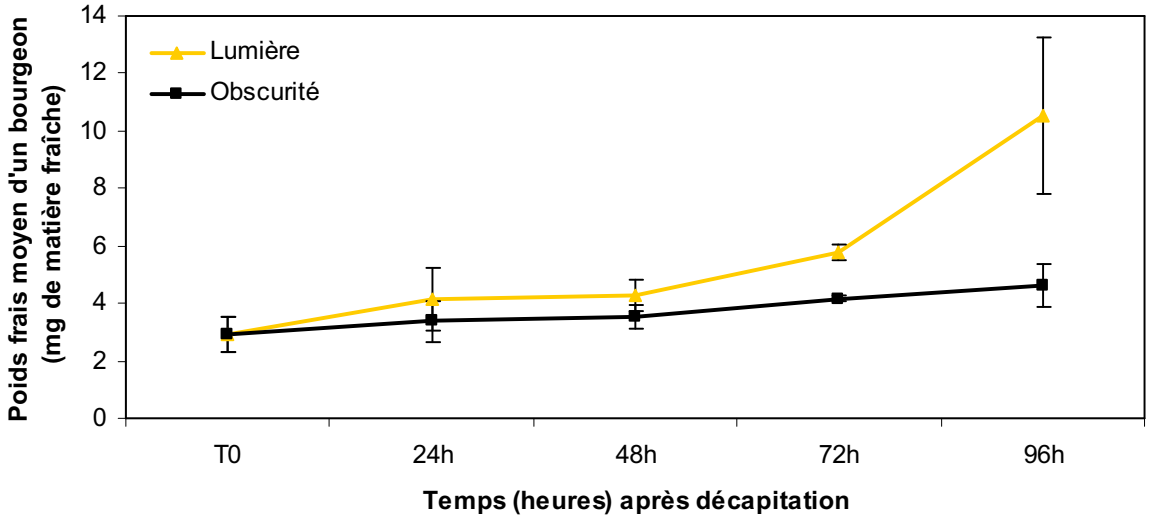


Figure 39 : *Evolution du poids moyen (en mg de matière fraîche) du bourgeon distal de plantes expérimentales Rosa hybrida 'Radrazz' placée juste après décapitation (T0) pendant 24 à 96 h sous lumière blanche (200 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h) ou à l'obscurité.*
Chaque valeur représente la moyenne ± erreur standard, avec n = 3 lots de bourgeons distaux. Les astérisques indiquent les différences significatives par rapport à la condition obscurité pour le même temps (p<0,05).

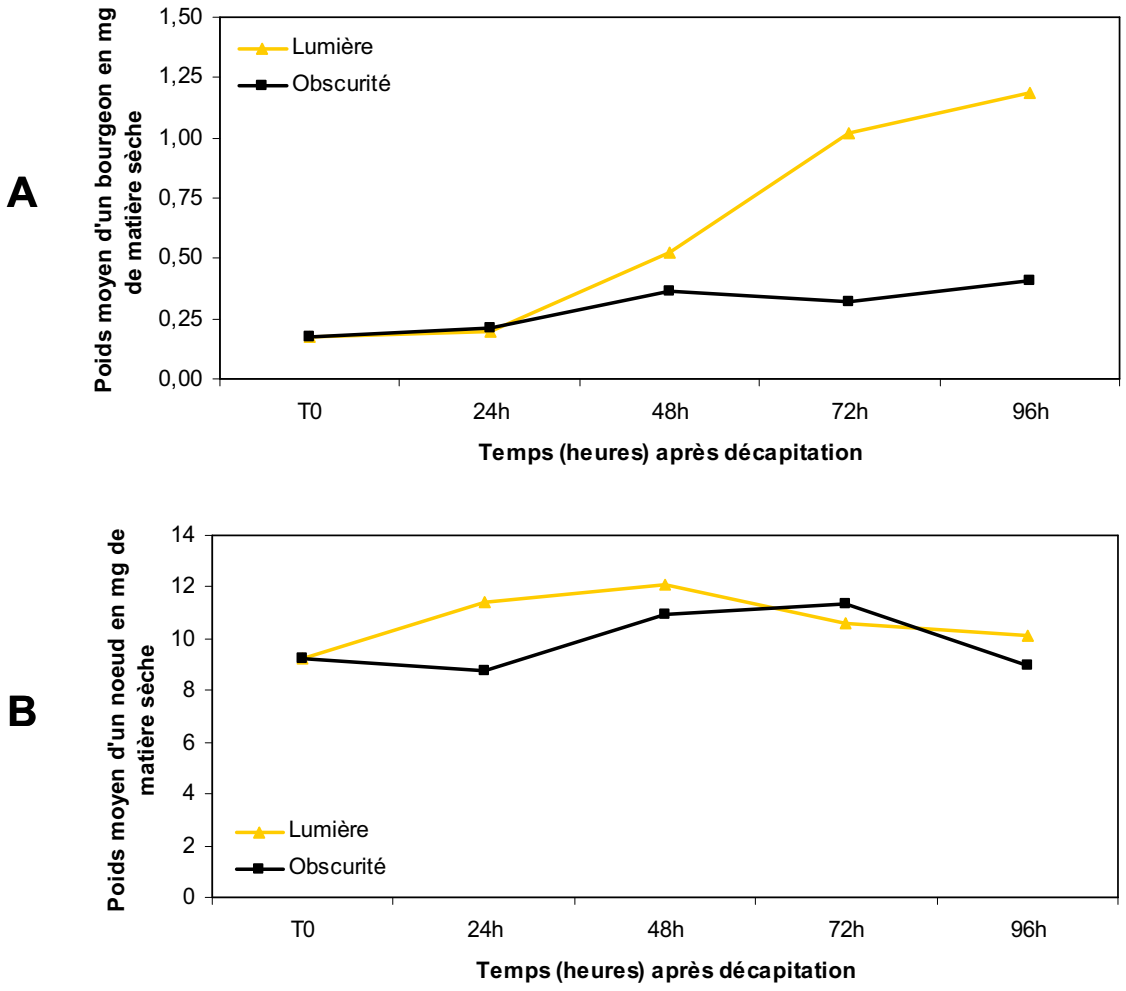


Figure 40 : *Evolution du poids moyen (en mg de matière sèche) A) d'un bourgeon distal et B) de la portion de tige portant ce bourgeon d'une plante expérimentale* *Rosa hybrida* *'Radrazz' placée juste après décapitation (T0) pendant 24 à 96 h sous lumière blanche (200 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h) ou à l'obscurité.*
Chaque valeur correspond à la pesée d'un échantillon de 30 bourgeons ou de 15 nœuds.

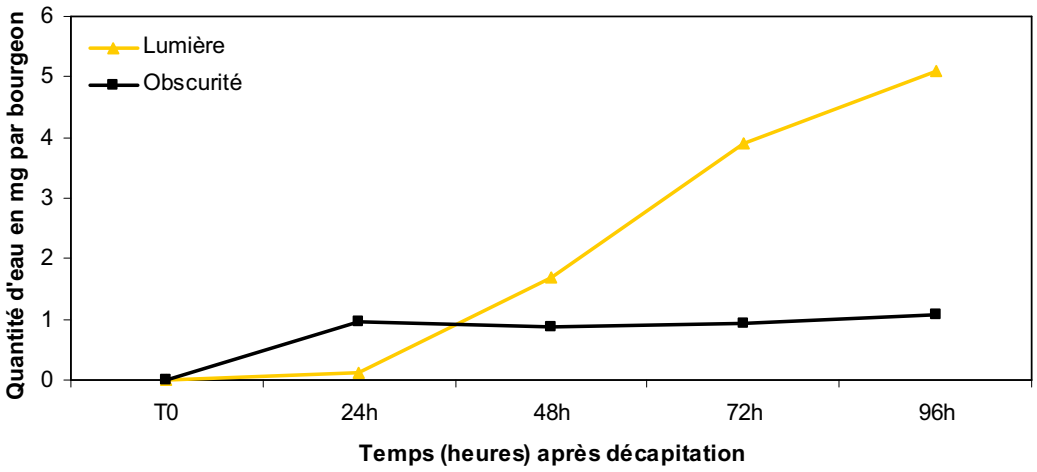


Figure 41 : *Evolution de la quantité d'eau (en mg) par bourgeon distal d'une plante expérimentale Rosa hybrida 'Radrazz' placée juste après décapitation (T0) pendant 24 à 96 h sous lumière blanche (200 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h) ou à l'obscurité.*
Chaque valeur correspond à la pesée d'un échantillon de 30 bourgeons.

Tableau VI : *Pourcentages de débourrement des bourgeons distaux des plantes expérimentales appartenant à 6 variétés de rosier, cultivées pendant 12 jours sous une lumière blanche, bleue ou rouge clair.*

	Source lumineuse (16h/24h)	**Lumière blanche**		**Lumière bleue**		**Lumière blanche**		**Lumière rouge clair**	
	Flux de photons (µmol.m^{-2}.s^{-1})	**200**		**200**		**20**		**20**	
Espèce	**Variété**	**Nombre de plantes**	**% de débourrement**	**Nombre de plantes**	**% de débourrement**	**Nombre de plantes**	**% de débourrement**	**Nombre de plantes**	**% de débourrement**
Rosa hybrida	'Radrazz'	20	100	19	100	19	100	18	94.4 ± 7.9
	'Meiprille'	19	100	13	100	15	73.2 ± 2.5	19	52.8 ± 3.9
	'Meiratcan'	18	100	13	100	6	100	14	78.6 ± 10.1
	'Meichibon'	19	100	16	100	14	92.9 ± 10.1	10	90.0 ± 14.1
Rosa chinensis	'Old blush'	20	100	11	100	16	93.7 ± 8.8	19	73.9 ± 5.5
Rosa wichurana	'Basye's thornless'	17	100	19	100	15	100	19	95.0 ± 7.1

Chaque valeur représente la moyenne ± erreur standard de 2 répétitions biologiques.

Tableau VII : *Pourcentages de débourrement des bourgeons distaux des plantes expérimentales de Rosa hybrida 'Radrazz', cultivées pendant 12 jours sous une lumière blanche ou rouge sombre.*

	% de débourrement	
	Lumière blanche (2 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h)	**Lumière rouge sombre** (2,7 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h)
Rosa hybrida 'Radrazz'	83,3 ± 4,7	0

Chaque valeur représente la moyenne ± erreur standard de 2 répétitions biologiques, avec n = 10 à 15 plantes par lot.

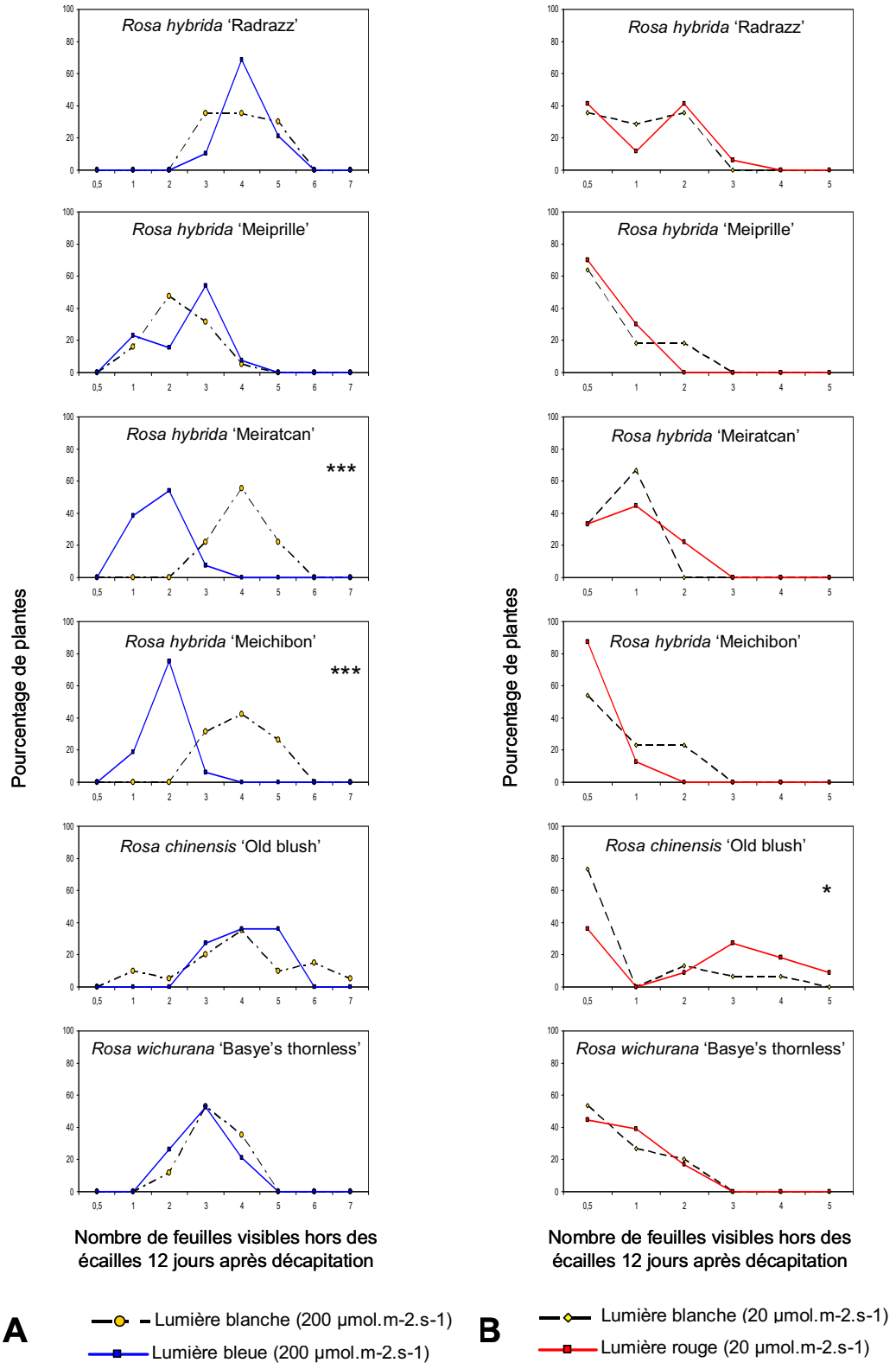
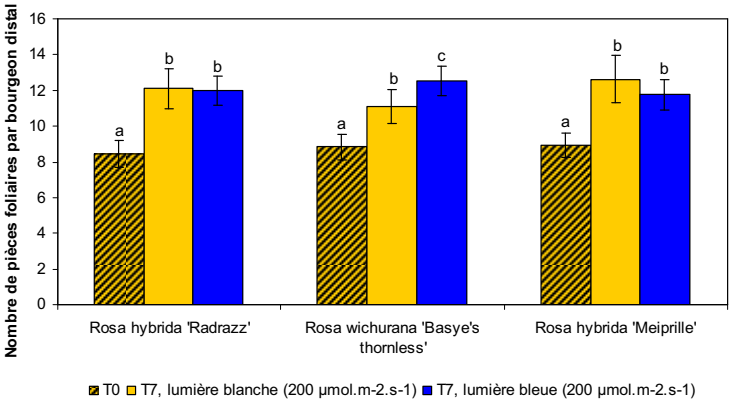
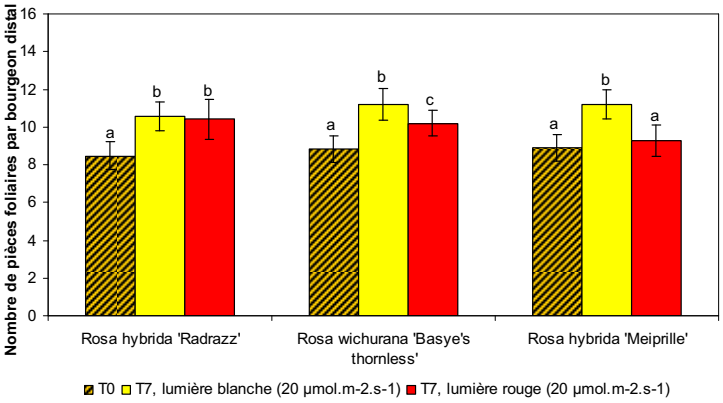


Figure 42 : *Proportion relative des plantes présentant un bourgeon distal débourré avec des feuilles visibles hors des écailles après 12 jours de culture A) sous lumière blanche ou lumière bleue (200 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h) (n = 13 à 20 plantes) et B) sous lumière blanche ou lumière rouge clair (20 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h) (n = 6 à 20 plantes).*
Les astérisques indiquent les différences significatives ($p<0,05$) entre la distribution sous lumière blanche et celle sous lumière bleue ou rouge pour chaque cultivar.

A



B



C

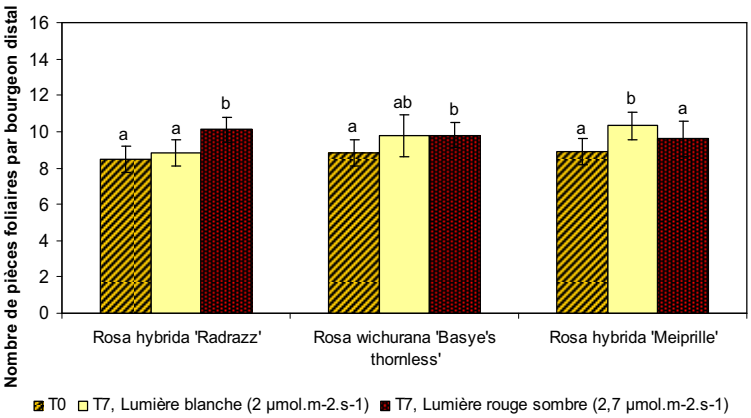


Figure 43 : *Nombre moyen de pièces foliaires (primordia, jeune feuilles et écailles) par bourgeon distal juste après décapitation (T0) et après 7 jours de culture sous A) lumière bleue (200 µmol.m^{-2}.s^{-1}), B) lumière rouge clair (20 µmol.m^{-2}.s^{-1}) ou C) lumière rouge sombre (2,7 µmol.m^{-2}.s^{-1}), chez 3 variétés de rosier.*

Chaque valeur représente la moyenne ± erreur standard, avec n = 10 plantes au minimum. Les différentes lettres indiquent les différences significatives ($p<0,05$).

Tableau VIII : *Pourcentages de débourrement des bourgeons distaux des plantes expérimentales de Rosa hybrida 'Radrazz', cultivées pendant 12 jours sous une lumière blanche, bleue ou rouge clair.*

Source lumineuse (20 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h)	**Lumière blanche**		**Lumière bleue**		**Lumière rouge clair**	
	Nombre de plantes	**% de débourrement**	**Nombre de plantes**	**% de débourrement**	**Nombre de plantes**	**% de débourrement**
Rosa hybrida 'Radrazz'	19	100	13	77,4 ± 8,4	18	94.4 ± 7.9

Chaque valeur représente la moyenne ± erreur standard de 2 répétitions biologiques.

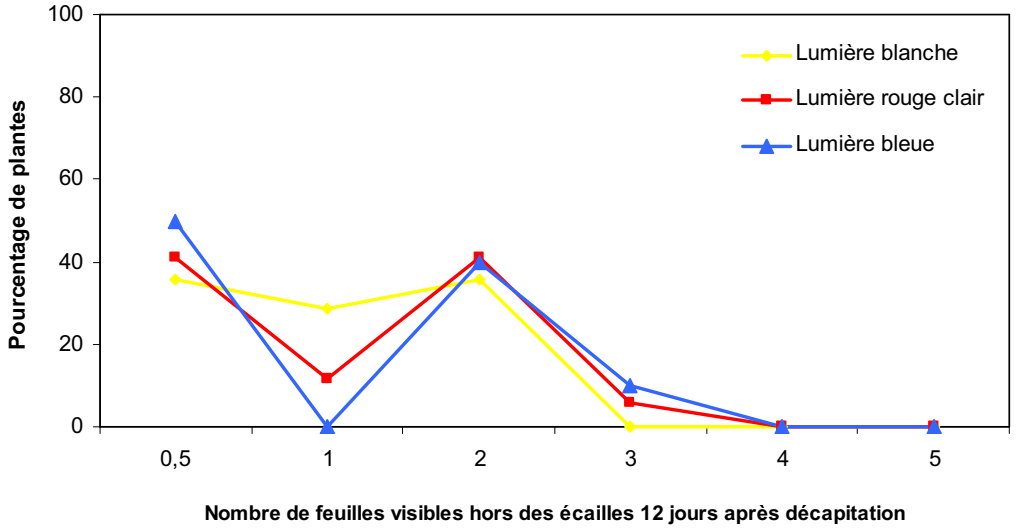


Figure 44 : *Proportion relative des plantes expérimentales Rosa hybrida 'Radrazz' présentant un bourgeon distal débourré avec des feuilles visibles hors des écailles après 12 jours de culture sous lumière blanche, bleue ou rouge clair (20 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h).*
Aucune différence significative (p<0,05) n'a été mesurée entre les 3 distributions, n = 6 à 20 plantes.

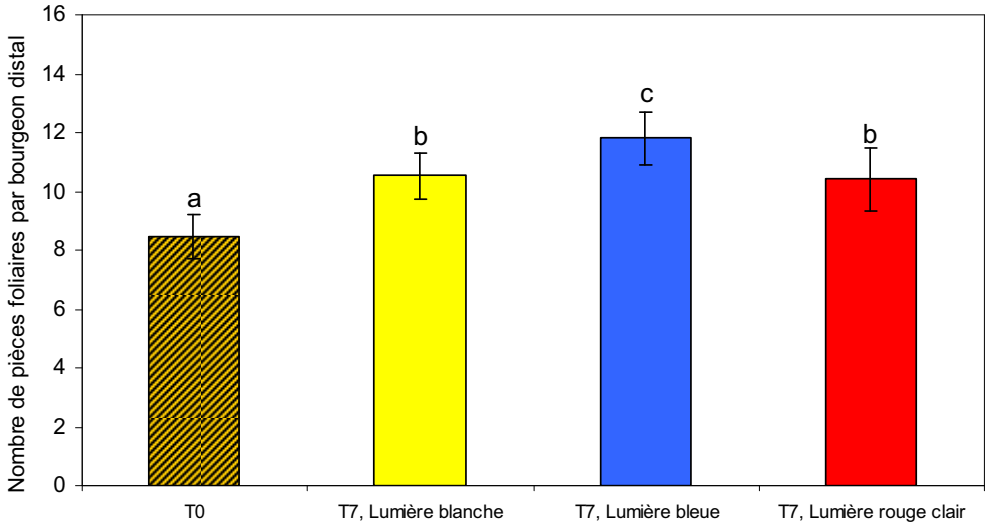


Figure 45 : *Nombre moyen de pièces foliaires (primordia, jeunes feuilles et écailles) par bourgeon distal de plantes expérimentales Rosa hybrida 'Radrazz' juste après décapitation (T0) et après 7 jours de culture (T7) sous lumière blanche, bleue et rouge clair (20 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h).*
Chaque valeur représente la moyenne ± erreur standard avec n = 10 plantes au minimum. Les différentes lettres indiquent les différences significatives (p<0,05).

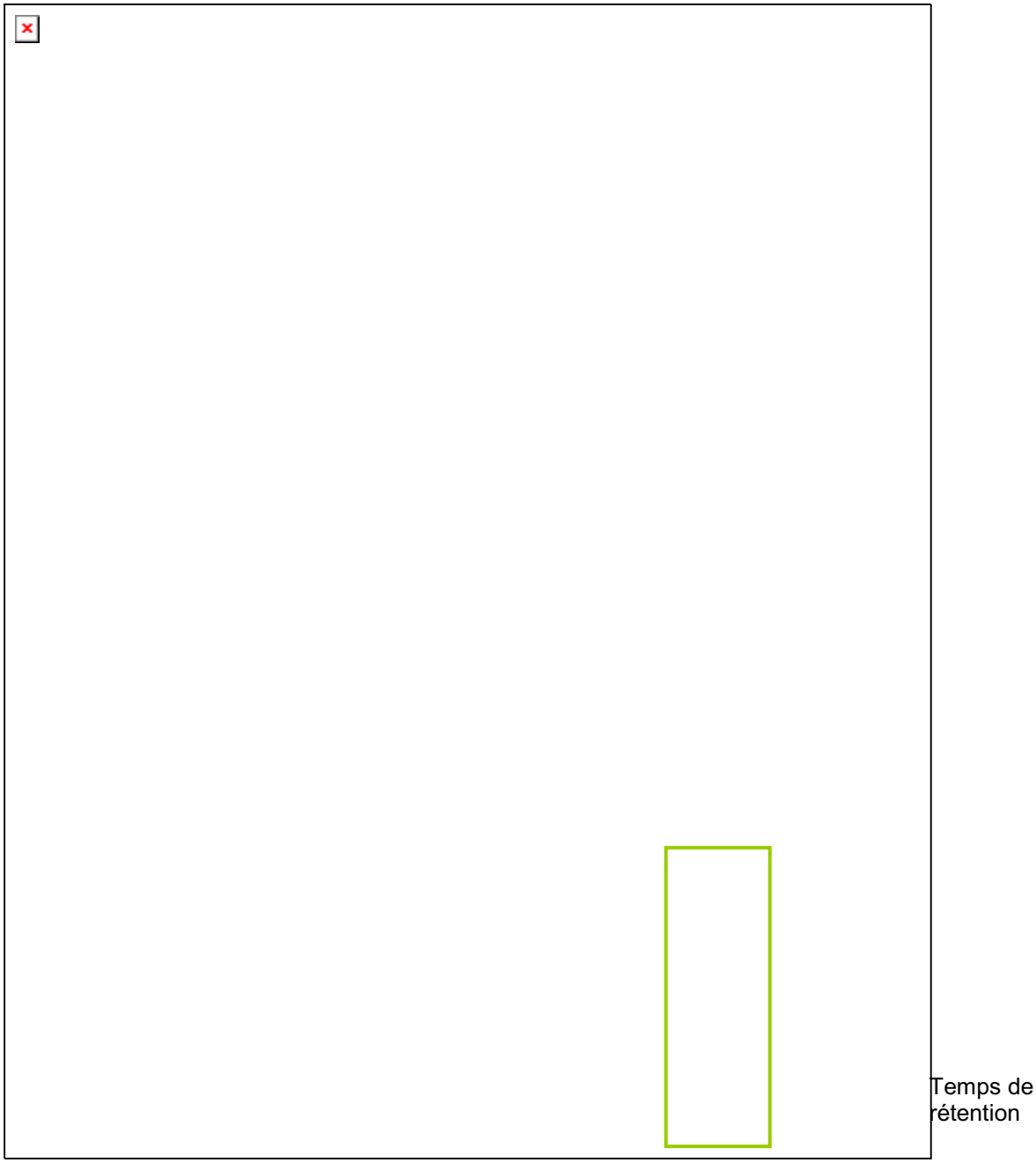


Figure 46 : *Profil d'élution d'un échantillon de bourgeons prélevés juste après décapitation (T0) obtenu à la sortie de la colonne permettant la fixation de molécules carbonées (détection par réfractométrie).*
Pour un temps de rétention de 25 minutes (cadre vert), aucun pic n'est observé, signifiant l'absence de sorbitol dans l'échantillon. Des profils similaires ont été obtenus pour tous les échantillons testés (96 h lumière et obscurité, bourgeons et nœuds).

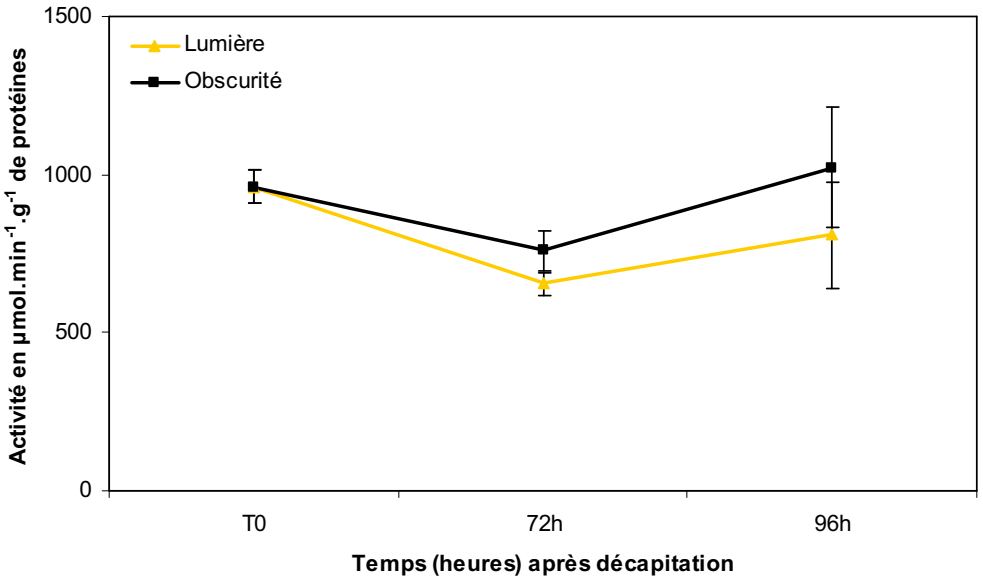


Figure 47 : *Variations de l'activité NAD-SDH au sein des bourgeons de plantes expérimentales Rosa hybrida 'Radrazz' placées juste après décapitation (T0) pendant 72 à 96 h sous lumière blanche (200 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h) ou à l'obscurité.*
Chaque valeur représente la moyenne ± erreur standard, avec n = 3 lots de bourgeons distaux. Les astérisques indiquent les différences significatives par rapport à la condition obscurité pour le même temps ($p<0,05$).

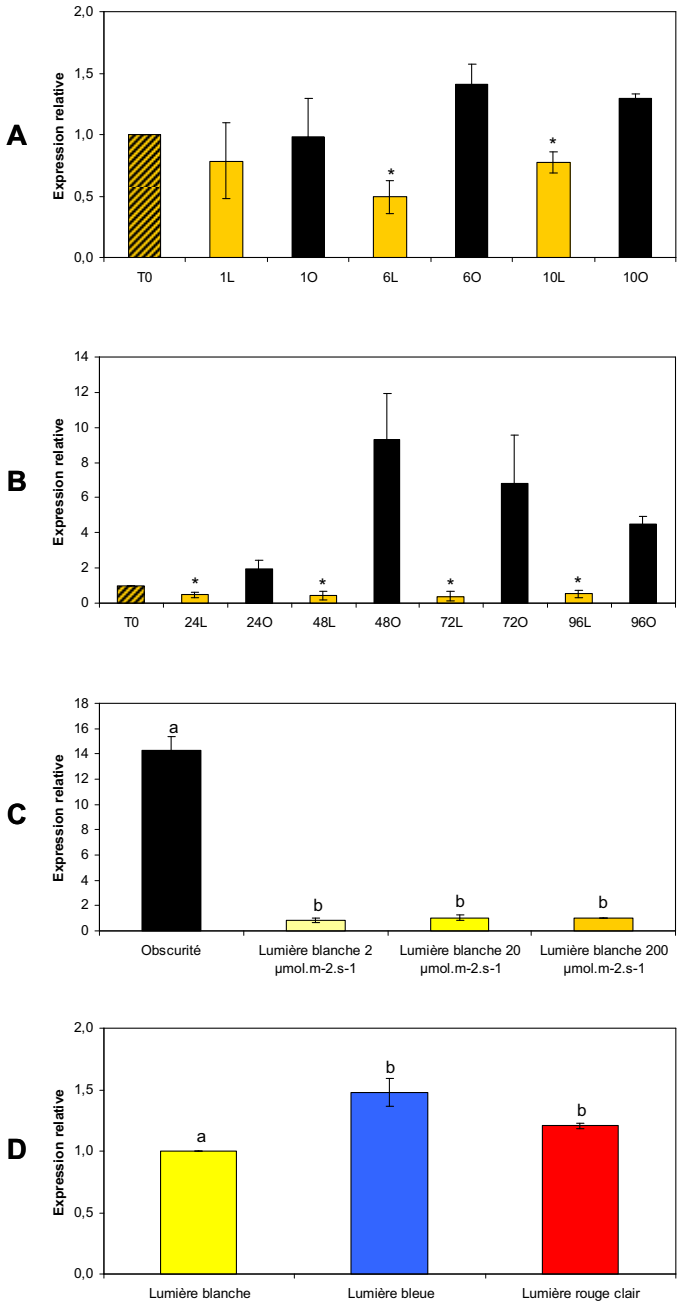


Figure 48 : *Expression du gène codant une NAD-SDH dans les bourgeons distaux de plantes expérimentales* *Rosa hybrida* *'Radrazz' placées juste après décapitation (T0, hachures) sous différents traitements lumineux : A) pendant 1 à 10 h et B) pendant 24 à 96 h sous lumière blanche (200 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h) (L, barres jaunes) ou à l'obscurité (O, barres noires), C) pendant 72 h sous différentes quantités de lumière blanche (0, 2, 20 et 200 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h) et D) pendant 72 h sous différentes qualités de lumière (lumière blanche, lumière bleue et lumière rouge clair, 20 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h).*
Chaque valeur représente la moyenne ± erreur standard, avec n = 3 lots de bourgeons distaux. L'étude de l'expression a été réalisée par RT-PCR quantitative en temps réel et la normalisation de l'expression a été réalisée par rapport au gène de référence EF-1α. A et B) Les astérisques indiquent les différences significatives par rapport à la condition obscurité pour le même temps ($p<0,05$). C et D) Les différentes lettres indiquent les différences significatives ($p<0,05$).

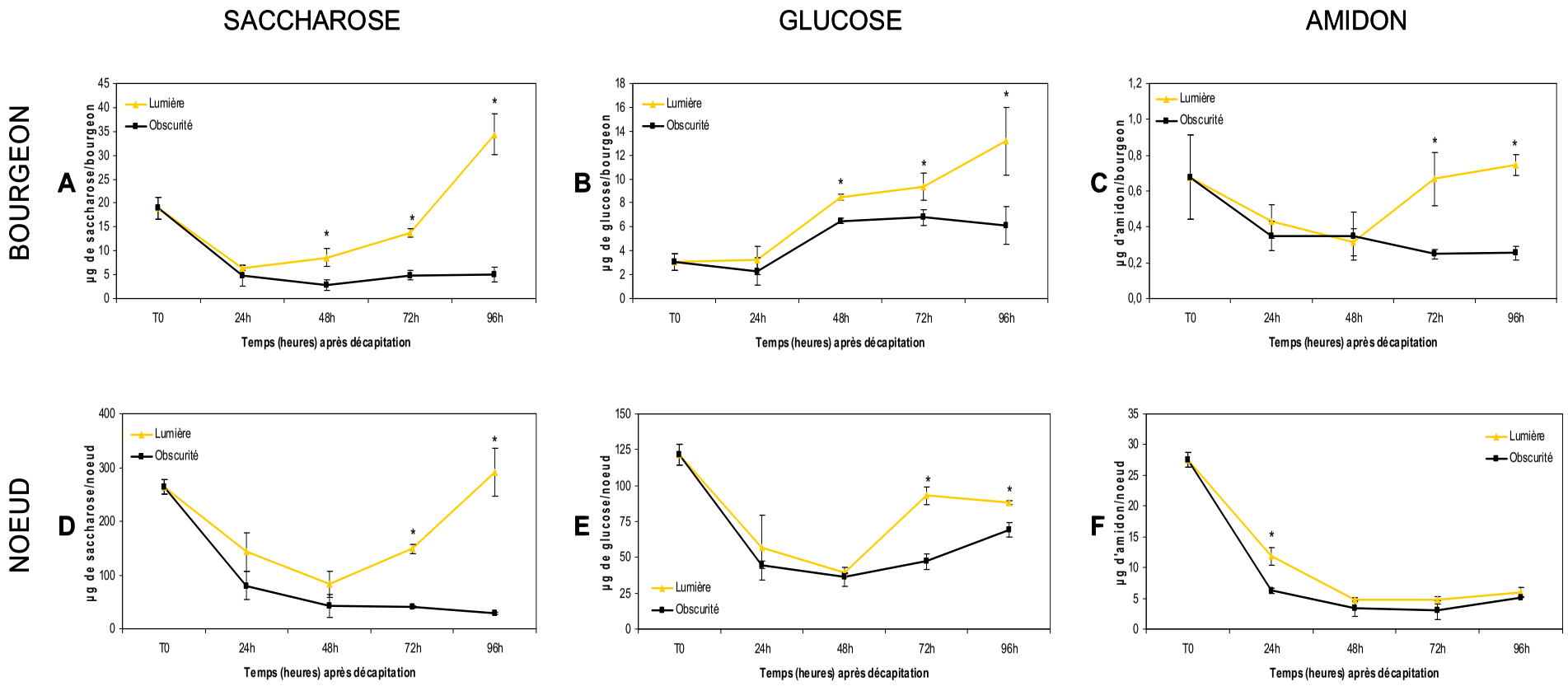


Figure 49 : *Evolution de la quantité de saccharose (A, D), de glucose (B, E) et d'amidon (C, F) par bourgeon distal (A, B et C) et par nœud (D, E et F) d'une plante expérimentale* *Rosa hybrida* *'Radrazz' placée juste après décapitation (T0) pendant 24 à 96 h sous lumière blanche (200 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h) ou à l'obscurité.*

Chaque valeur représente la moyenne ± erreur standard, avec n = 3 lots de bourgeons distaux. Les astérisques indiquent les différences significatives par rapport à la condition obscurité pour le même temps ($p<0,05$).

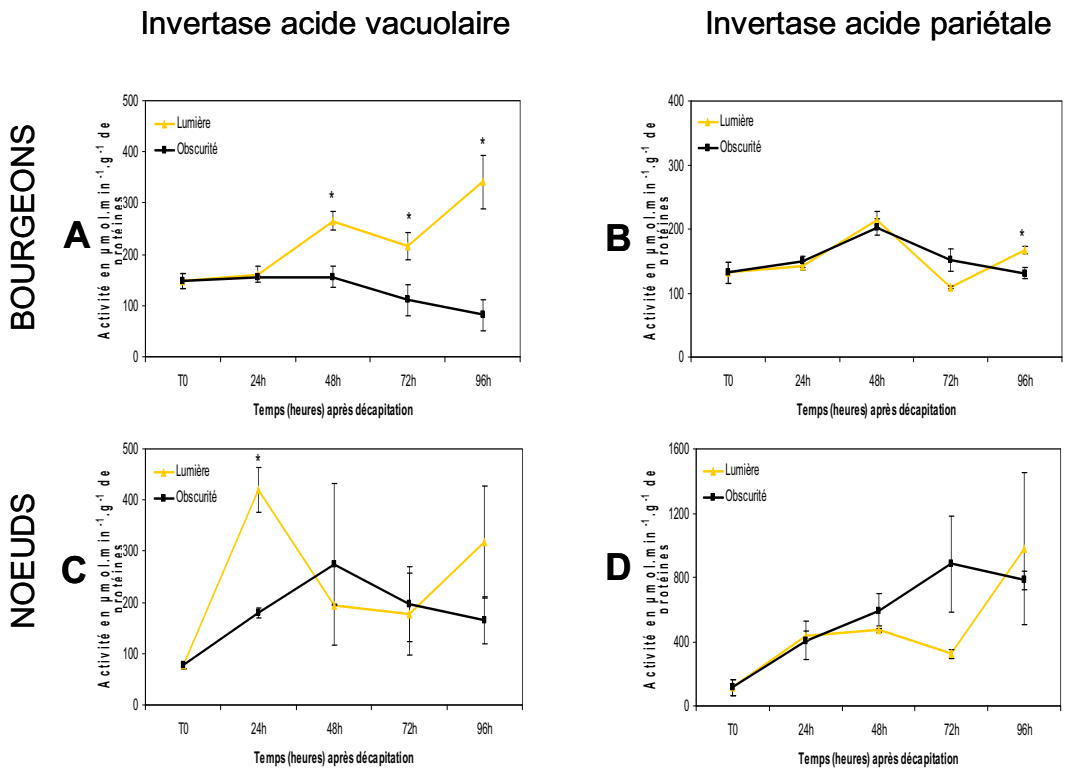


Figure 50 : *Variations des activités invertases acides vacuolaire (A, C) et pariétale (B, D) au sein des bourgeons et des nœuds de plantes expérimentales* *Rosa hybrida* *'Radrazz' placées juste après décapitation (T0) pendant 24 à 96 h sous lumière blanche (200 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h) ou à l'obscurité.*

Chaque valeur représente la moyenne ± erreur standard, avec n = 3 lots de bourgeons distaux. Les astérisques indiquent les différences significatives par rapport à la condition obscurité pour le même temps ($p<0,05$).

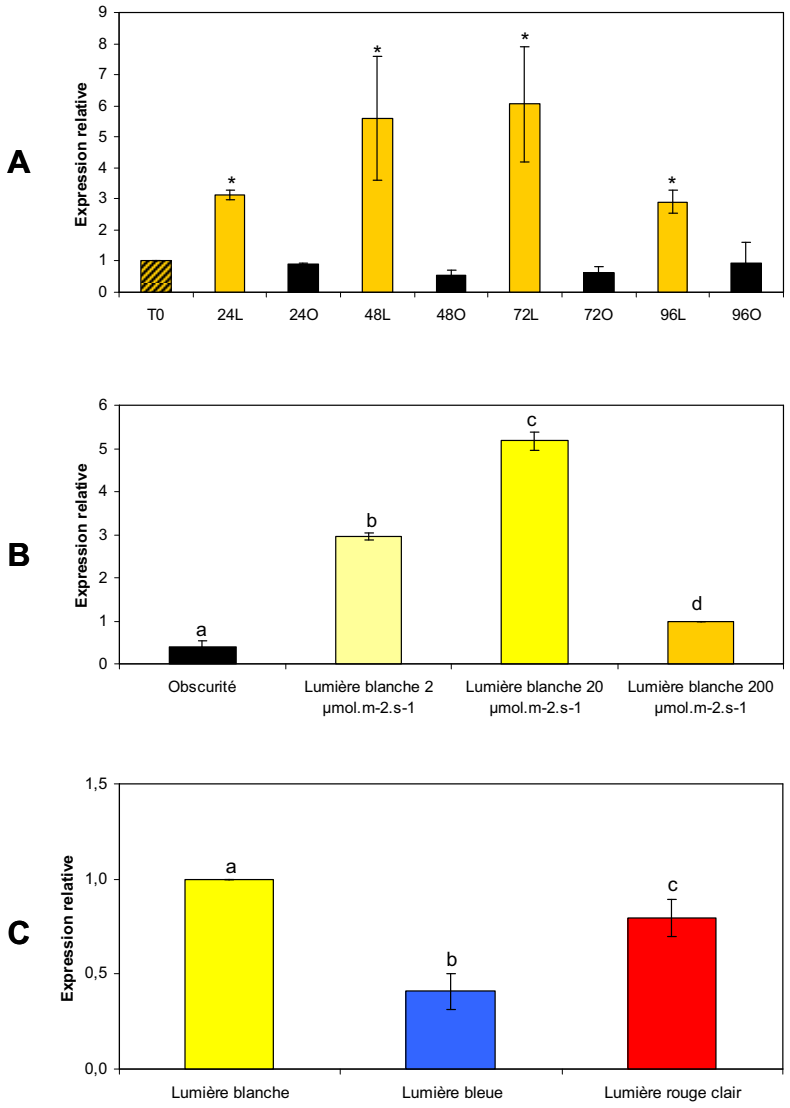


Figure 51 : *Expression du gène codant une invertase acide vacuolaire (IAV) dans les bourgeons distaux de plantes expérimentales* *Rosa hybrida* *'Radrazz' placées juste après décapitation (T0, hachures) sous différents traitements lumineux : A) pendant 24 à 96 h sous lumière blanche (200 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h) (L, barres jaunes) ou à l'obscurité (O, barres noires), B) pendant 72 h sous différentes quantités de lumière blanche (0, 2, 20 et 200 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h) et C) pendant 72 h sous différentes qualités de lumière (lumière blanche, lumière bleue et lumière rouge clair, 20 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h).*
Chaque valeur représente la moyenne ± erreur standard, avec n = 3 lots de bourgeons distaux. L'étude de l'expression a été réalisée par RT-PCR quantitative en temps réel et la normalisation de l'expression a été réalisée par rapport au gène de référence EF-1α. A) Les astérisques indiquent les différences significatives par rapport à la condition obscurité pour le même temps ($p<0,05$). B et C) Les différentes lettres indiquent les différences significatives ($p<0,05$).

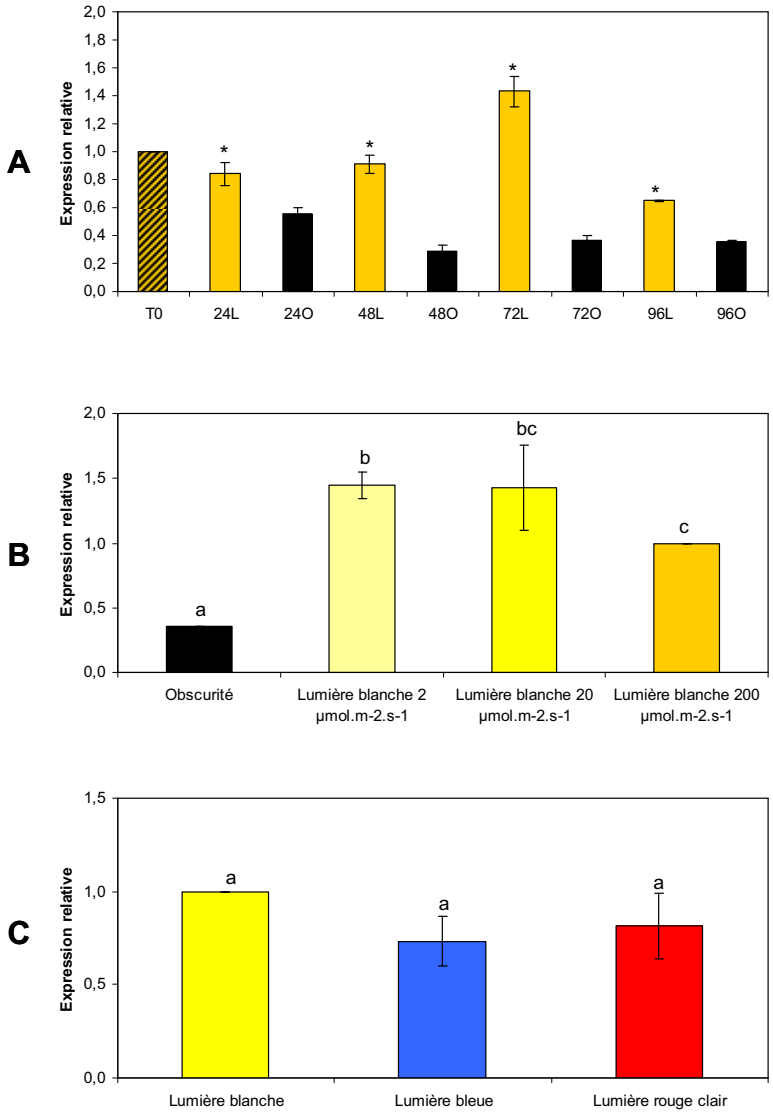


Figure 52 : *Expression du gène codant une saccharose synthase (SUSY) dans les bourgeons distaux de plantes expérimentales* *Rosa hybrida* *'Radrazz' placées juste après décapitation (T0, hachures) sous différents traitements lumineux : A) pendant 24 à 96 h sous lumière blanche (200 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h) (L, barres jaunes) ou à l'obscurité (O, barres noires), B) pendant 72 h sous différentes quantités de lumière blanche (0, 2, 20 et 200 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h) et C) pendant 72 h sous différentes qualités de lumière (lumière blanche, lumière bleue et lumière rouge clair, 20 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h).*
Chaque valeur représente la moyenne ± erreur standard, avec n = 3 lots de bourgeons distaux. L'étude de l'expression a été réalisée par RT-PCR quantitative en temps réel et la normalisation de l'expression a été réalisée par rapport au gène de référence EF-1α. A) Les astérisques indiquent les différences significatives par rapport à la condition obscurité pour le même temps ($p<0,05$). B et C) Les différentes lettres indiquent les différences significatives ($p<0,05$).

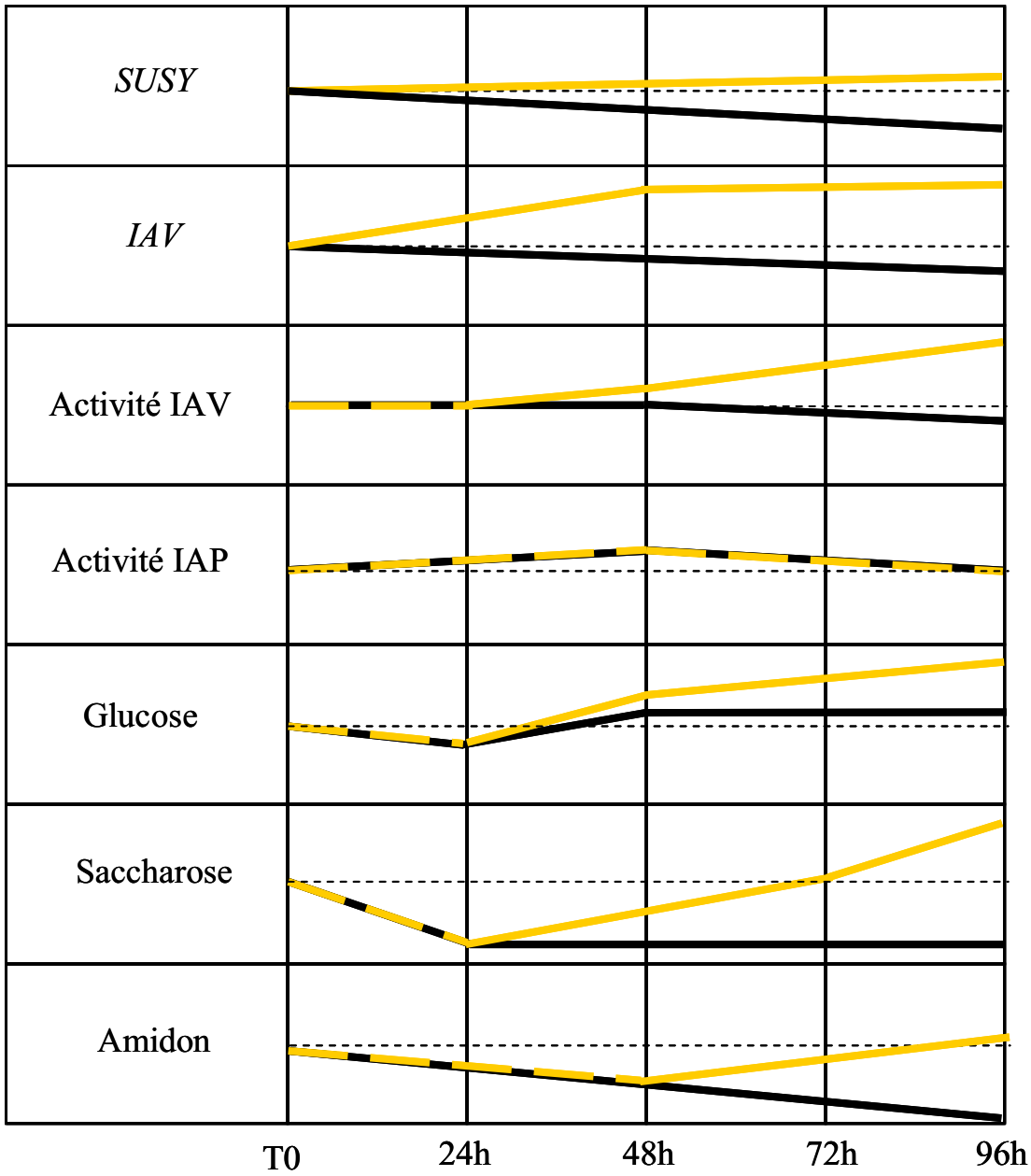


Figure 53 : *Schéma récapitulatif des résultats concernant le photocontrôle du métabolisme du saccharose au cours du débourrement du bourgeon axillaire distal de plantes expérimentales Rosa hybrida 'Radrazz' placées juste après décapitation (T0) pendant 24 à 96 h sous lumière blanche (200 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h) (en jaune) ou à l'obscurité (en noir).*
Les profils observés pour les variations des quantités de sucres, des activités enzymatiques et des expressions géniques sont représentés par une ligne au cours du temps.

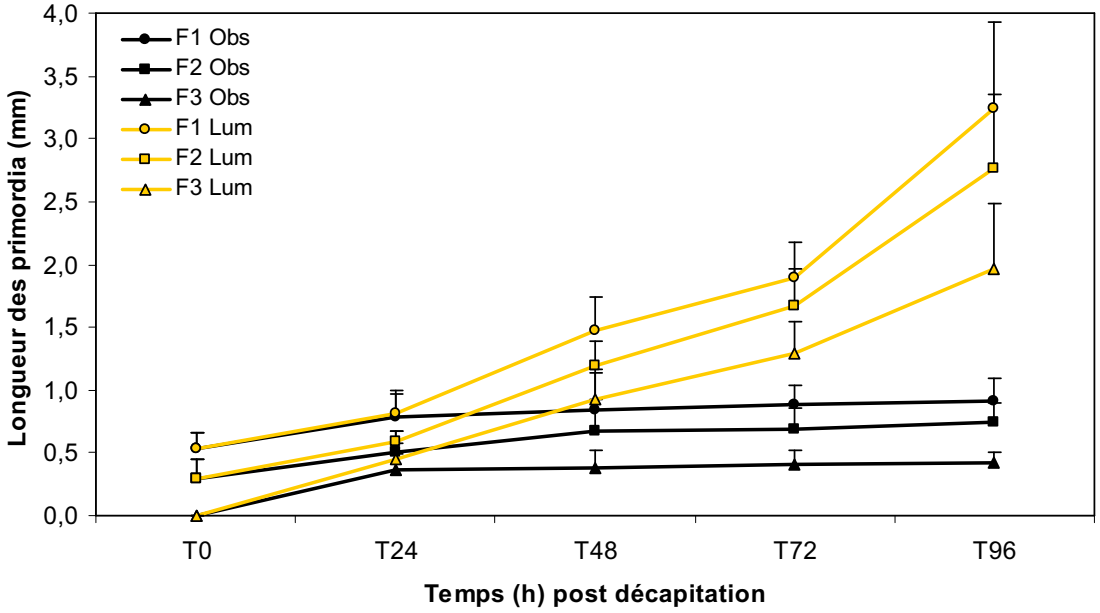


Figure 54 : *Evolution de la taille des trois premiers primordia foliaires des bourgeons axillaires distaux de plantes expérimentales Rosa hybrida 'Radrazz' juste après décapitation (T0) et après 24, 48, 72 ou 96 heures en présence de lumière blanche (200 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h) ou d'obscurité.*

Chaque valeur représente la moyenne ± erreur standard, avec n = 7 à 11 plantes. Les valeurs sont significativement différentes entre les conditions lumière et obscurité à partir de 48 h post décapitation, quelque soit le primordium considéré ($p<0,001$).

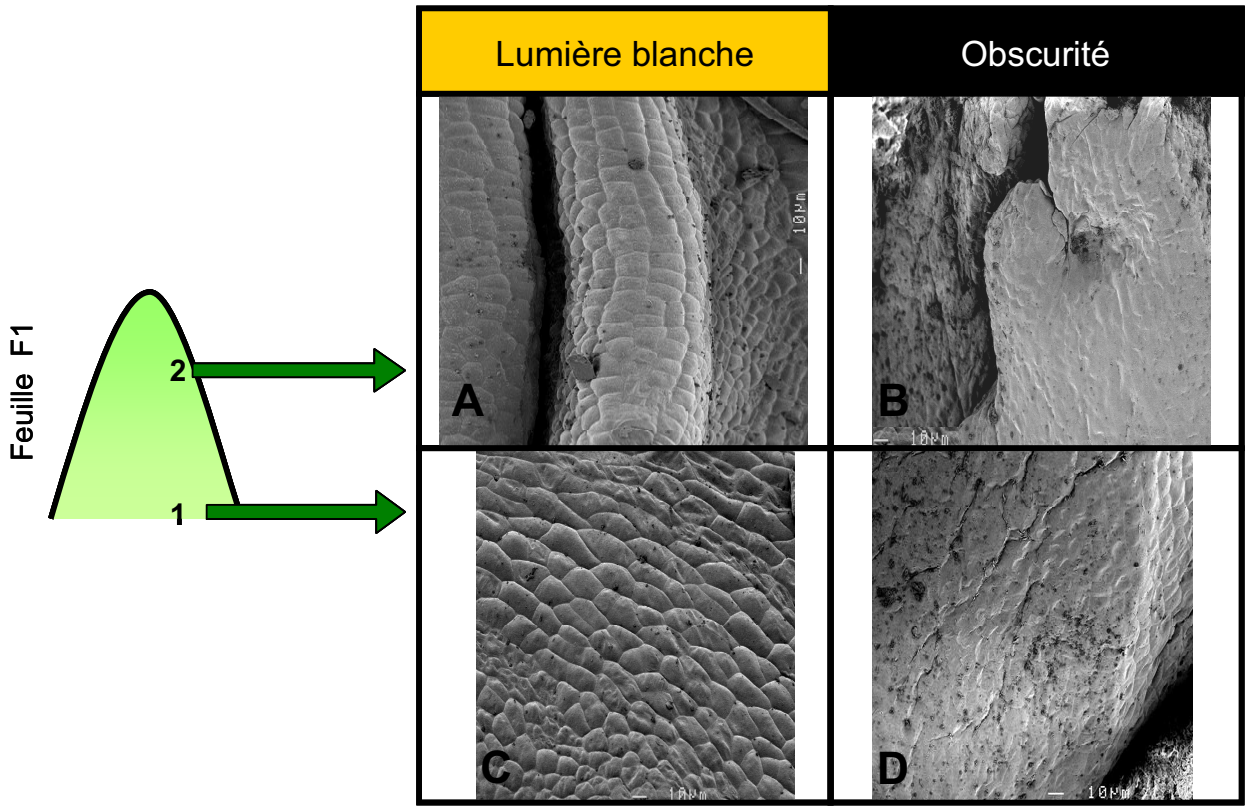


Figure 55 : *Observations au microscope électronique à balayage des cellules de la première feuille assimilatrice F1 de bourgeons distaux de plantes expérimentales Rosa hybrida 'Radrazz' cultivées pendant 7 jours à la lumière blanche (200 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h) ou à l'obscurité.*
Les photos sont prises dans deux zones distinctes de la jeune feuille (schéma): la zone 1 située à la base (C et D) et la zone 2 située à l'extrémité (A et B) du primordium. Barre d'échelle = 10 µm.

Tableau IX : *Longueur moyenne des cellules de la première feuille assimilatrice de bourgeon axillaire distal de plantes expérimentales Rosa hybrida 'Radrazz' cultivées pendant 7 jours sous lumière blanche (200 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h) ou à l'obscurité.*

Les mesures ont été réalisées dans deux zones distinctes de la jeune feuille : la zone 1 située à la base et la zone 2 située à l'extrémité. Les tailles des 15 cellules les plus grandes dans un champ d'observation (x 500) ont été mesurées. Chaque valeur représente la moyenne ± erreur standard, avec n = 5 à 9 plantes. Les astérisques indiquent des différences significatives entre la condition lumière et la condition obscurité pour une zone donnée ($p<0,05$).

Zone de la jeune feuille	**Longueur moyenne des cellules (µm)**	
	Lumière blanche	Obscurité
1	19,49 ± 0,18 (*)	15,00 ± 0,17
2	29,91 ± 0,52 (*)	19,65 ± 0,28

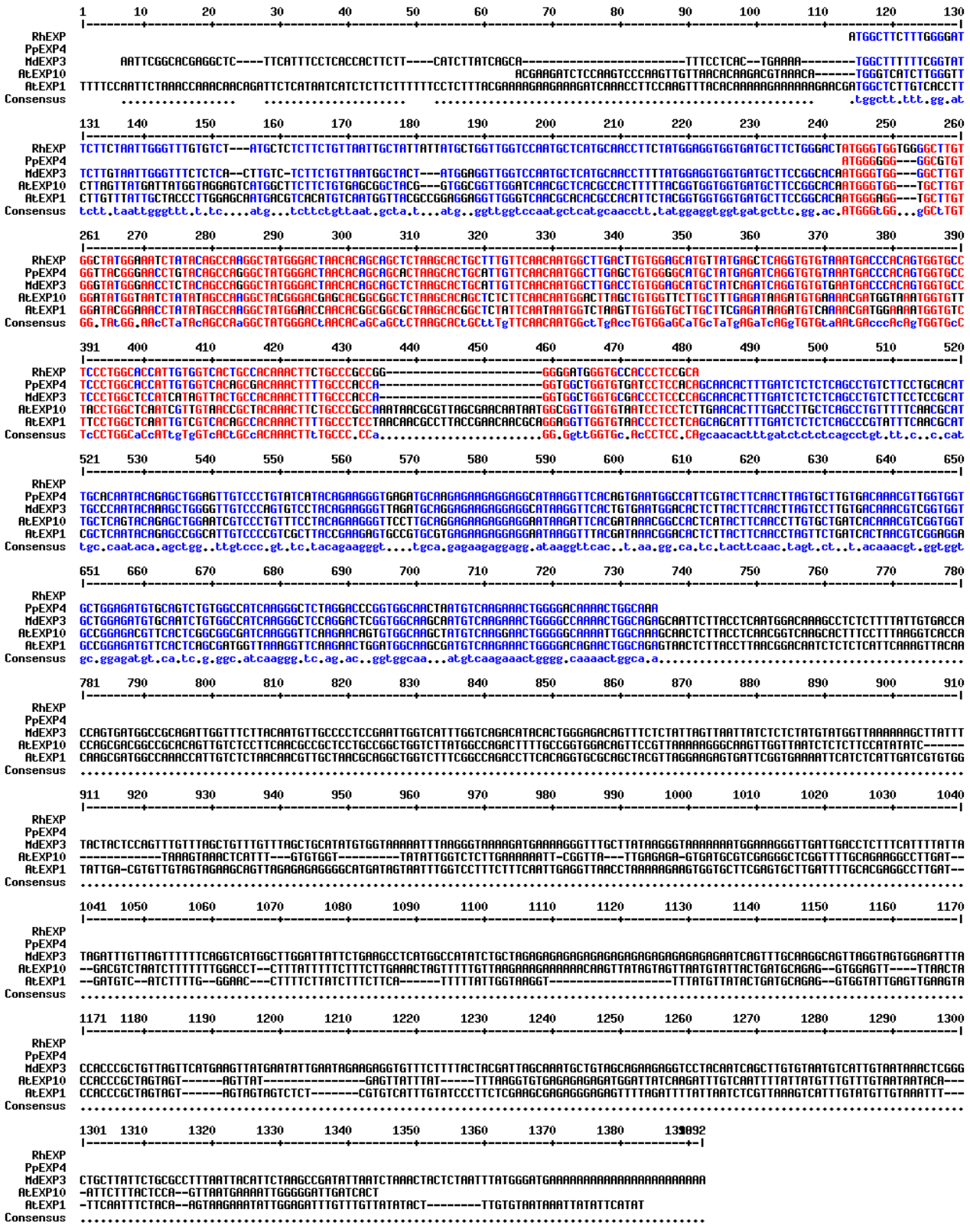


Figure 56 : *Alignement de séquences nucléotidiques d'expansines fortement homologues de l'expansine clonée chez le rosier (RhEXP).*

Les nucléotides en rouge présentent plus de 90% de similitudes entre les séquences, ceux en bleu 50% (Multalin http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html ; Corpet, 1988). Les numéros d'accessions des séquences sont cités dans le texte.

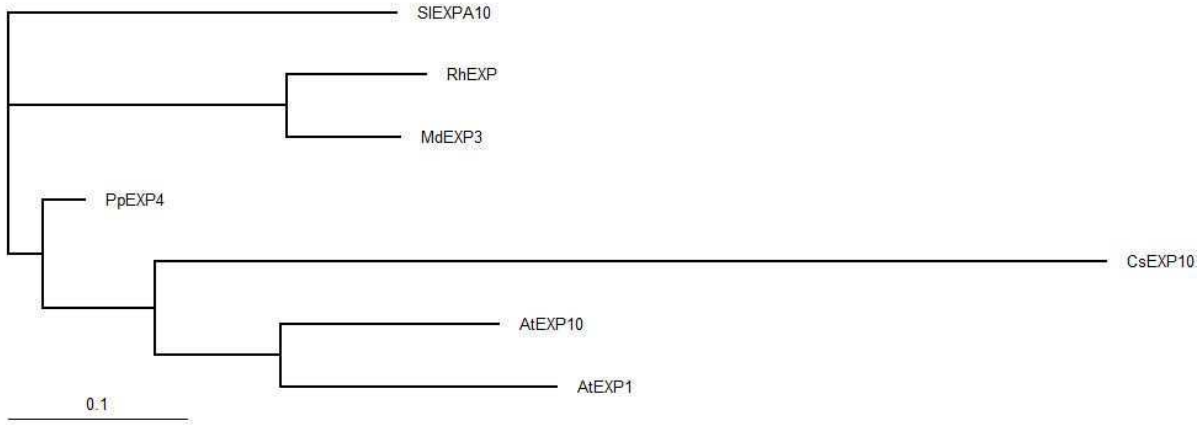


Figure 57 : *Arbre phylogénétique construit à partir de séquences nucléotidiques d'expansines de plantes.*
L'arbre a été construit à partir de l'alignement de séquences nucléotidiques réalisé par le programme ClustalW (Larkin *et al*., 2007) puis en utilisant le logiciel TreeView (Page, 1996). Les séquences utilisées pour l'analyse et leurs numéros d'accession (GenBank) respectifs sont : *AtEXP1* (*Arabidopsis thaliana,* NM_179537), *AtEXP10* (*Arabidopsis thaliana,* AF229437), *CsEXP10* (*Cucumis sativus*, AY940479), *MdEXP3* (*Malus domestica*, AF527800), *PpEXP4* (*Prunus persica*, AB054319), *RhEXP* (*Rosa hybrida*) et *SlEXP10* (*Solanum lycopersicum*, AF184233).

```
           1        10        20        30        40        50        60        70        80
           |--------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------|
RhEXP            MASLGILLIGFVSMLSSVNCYYYAG--WSNAHATFYGGGDASGTMGGGACGYGNLYSQGYGTNTAALSTALFNN
AtEXP            MGHLGFLVMIMVGVMASSVSG-YGGG-WINAHATFYGGGDASGTMGG-ACGYGNLYSQGYGTSTAALSTALFNN
FaEXP        MKMA-SAAFFLVGLLAM-VTSAHG-YGGGGWVNARATFYGGGDASGTMGG-ACGYGNLYSQGYGTNTAALSTALFNN
PpyEXP       MKMTFPSGFFLVGILAMLVASAHA-YGGG-WVNAHATFYGGGDASGTMGG-ACGYGNLYSQGYGTNTAALSTALFNN
SlEXP      MGII-IFILVLLFVDSCFNIVEGRIPGVYSGGSWETAHATFYGGSDASGTMGG-ACGYGNLYSQGYGVNTAALSTALFNN
PpeEXP     MGVVSVSACLASLLISLMWVAEARIPGVYSGGAWEAAHATFYGGSDASGTMGG-ACGYGNLYSQGYGVSTAALSTALFNN
MdEXP                                      GHATFYGGSDASGTMGG-TCGYGNLYSQGYGVNTGALSTALSNS
Consensus  .........lg.ll.g...m........y.gg.w.naHATFYGGgDASGTMGG.aCGYGNLYSQGYGtnTaALSTALfNn

           81       90       100       110       120       130       140       150       160
           |--------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------|
RhEXP      GLTCGACYELRCVNDPQW--CLPG--TIVVTATNFCPPGGWVPPSA
AtEXP      GLSCGSCFEIRCENDGKW--CLPG--SIVVTATNFCPPNNALANNNGGWCNPPLEHFDLAQPVFQRIAQYRAGIVPVSYR
FaEXP      GLGCGSCYEIRCVNDPKW--CLPG--SIVVTATNFCPPNNALPNNAGGWCNPPQHHFDLSQPVFQHIAQYKAGVVPVSYR
PpyEXP     GLGCGPCYEIRCVNDPKW--CLPG--SIVVTATNFCPPNNALPNNAGGWCNPPQHHFDLSQPIFQHIAQYKAGVVPVSYR
SlEXP      GLSCGACFELKCTNTPNWKWCLPGNPSILITATNFCPPNYALPNDNGGWCNPPRPHFDLAMPMFLKLAQYRAGIVPVTYR
PpeEXP     GLSCGACFEIKCANDPNW--CHSGSPSIFITATNFCPPNFAQPSDNGGWCNPPRPHFDLAMPMFLKIAEYRAGIVPVSYR
MdEXP      GLSCGACFELKCANQPQW--CKSGSPSIFVTATNFCPPNFAQPSDDGGWCNPPRTHFDLAMPMFLKIAEYRAGIVPVSYR
Consensus  GL.CGaC%ElrCvNdp.W..ClpG..sIv!TATNFCPPn.a.p..aggwcnpp..hfdl..p.f..ia.y.ag.vpvsyr

           161      170       180       190       200       210       220       230       240
           |--------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------|
RhEXP
AtEXP      RVPCRRGGIRFTINGHSYFNLVLITNVGGAGDVHSAAIKGSRTVWQAMSRNWGQNWQSNSYLNGQALSFKVTTSDGRTV
FaEXP      RVPCRRGGIRFTVNGHSYFNLVLITNVGGAGDVHSVSVKGSKTGWQAMSRNWGQNWQSNSYLNGQALSFKVTTSDGRTV
PpyEXP     RVPCRRGGIRFTINGHSYFNLVLITNVGGAGDVHSVSVKGSRTGWQAMSRNWGQNWQSNSYLNGQALSFKVTTSDGRTV
SlEXP      RIPCRKQGGIRFTINGFRYFNLVLITNVAGAGDIIKVWVKGTKTNWIPLSRNWGQNWQSNAVLTGQSLSFRVKASDHRSS
PpeEXP     RVPCRKRGGIRFTINGFRYFNLVLVSNVAGAGDIVRVSVKGSKTSWMSMSRNWGQNWQSNAVLVGQSLSFRVRGSDRRTS
MdEXP      RVPCRKQGGIRFTINGHKYFNLVLIHNVAGAGDIVKAYVKGTNTPWMSLSRNWGQNWQSNAILVGQSLSFRVTASDRRTS
Consensus  rvpcr..ggirfting..yfnlvli.nv.gagd.....vkg..t.w...srnwgqnwqsn..l.gq.lsf.v..sd.rt.

           241      250       260263
           |--------+---------+--|
RhEXP
AtEXP      VSFNAAPAGWSYGQTFAGGQFR
FaEXP      VSYNAAPARWSFGQTFTGAQFR
PpyEXP     VSYNAAPAGWSFGQTYSGAQFR
SlEXP      TSWNMVPSHWQFGQTFIGKNFKI
PpeEXP     TSWNVVPANWQFGQTFTGKNFRV
MdEXP      TSWNIVPSNWQFGQTFTGKNFRV
Consensus  .s.n..p..w.fgqtf.g..fr.
```

Figure 58 : *Alignement de la séquence protéique RhEXP avec différentes expansines végétales.* Les acides aminés en rouge présentent plus de 90% de similitude entre les séquences, ceux en bleu 50% (Multalin http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html ; Corpet, 1988). Les séquences sont identifiées par les abréviations de leur nom de genre et d'espère suivi de *EXP*. Les numéros d'accessions (GenBank) sont les suivants : *Arabidopsis thaliana* (AAF61713), *Fragaria ananassa* (ABA62612), *Pyrus pyrifolia* (ABR04073), *Solanum lycopersicum* (AAC63088), *Prunus persica* (BAC66787) et *Malus domestica* (BAD00017).

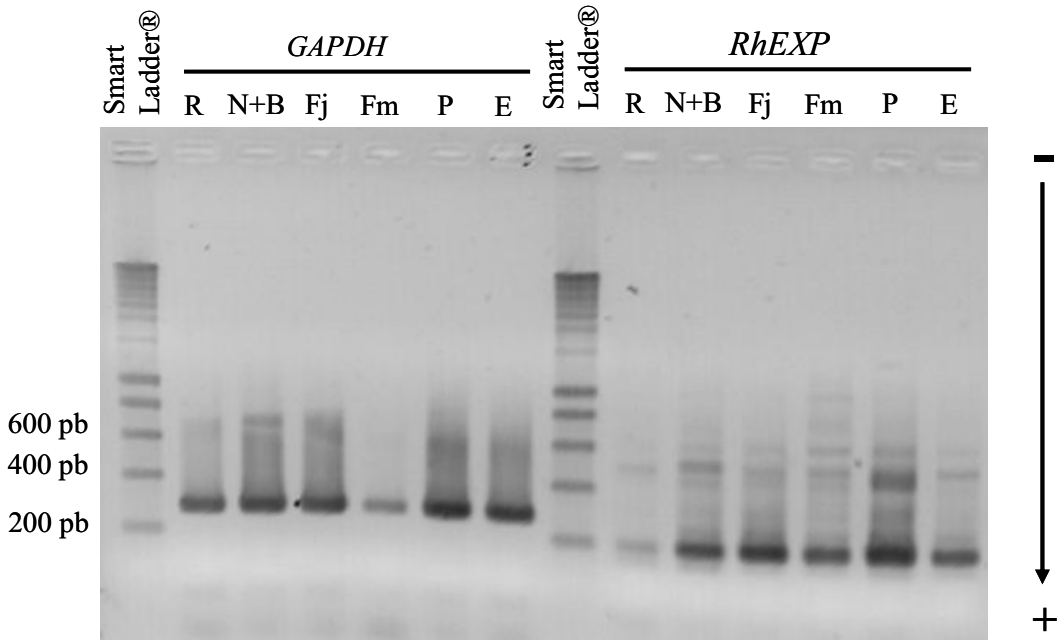


Figure 59 : *Etude par RT-PCR de l'expression du gène RhEXP dans différents organes de plantes expérimentales Rosa hybrida 'Radrazz'.*
R : Racines, N+B : Nœuds et Bourgeons, Fj : Feuilles jeunes (encore anthocyanées), Fm : Feuilles matures, P : Pétales et E : Etamines. Le gène de référence *GAPDH* a été utilisé comme témoin (taille attendue du fragment amplifié = 300 pb). Pour *RhEXP,* la taille attendue du fragment amplifié est de 205 pb. Les bandes supplémentaires indiquent la présence d'ADN génomique dans les échantillons (un intron est alors présent dans le gène considéré).

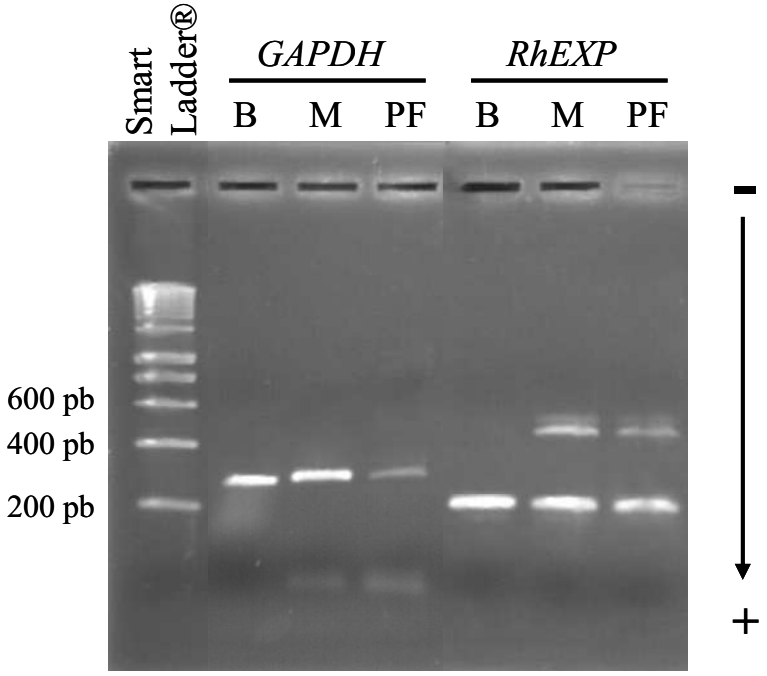


Figure 60 : *Etude par RT-PCR de l'expression du gène RhEXP dans le bourgeon (B), le méristème (M) et les primordia foliaires (PF) de plantes expérimentales* Rosa hybrida *'Radrazz'.* Le gène de référence *GAPDH* a été utilisé comme témoin (taille attendue du fragment amplifié = 300 pb). Pour *RhEXP,* la taille attendue du fragment amplifié est de 205 pb. La bande dont la taille est de 451 pb correspond à l'amplification du gène *RhEXP*, de part et d'autre d'un intron.

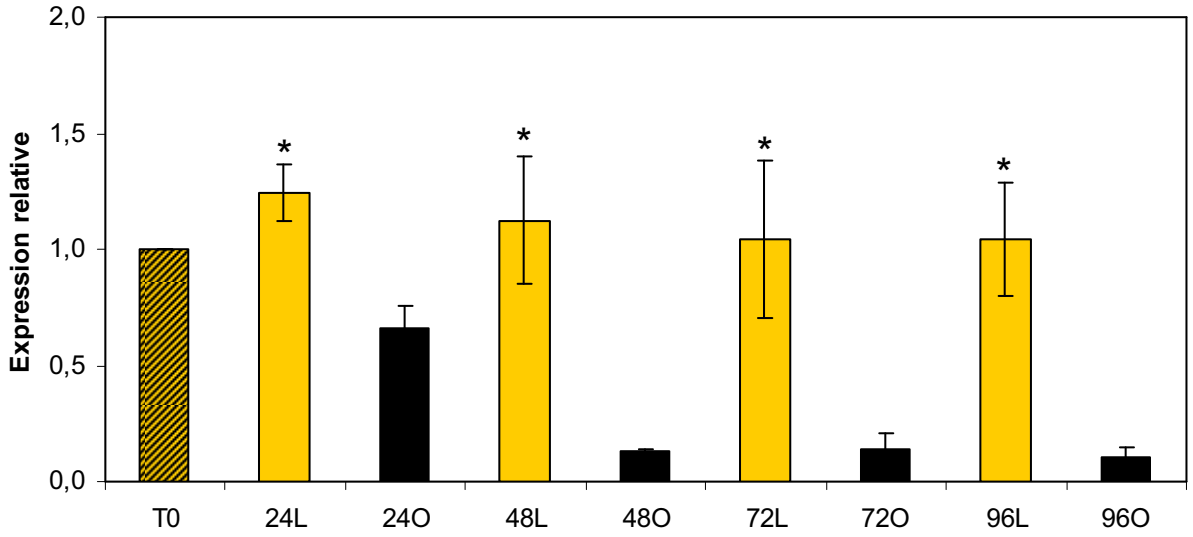


Figure 61 : *Expression du gène RhEXP dans les bourgeons axillaires distaux de plantes expérimentales Rosa hybrida 'Radrazz' placées juste après décapitation (T0, hachures) pendant 24 à 96 h sous lumière blanche (200 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h) (L, barres jaunes) ou à l'obscurité (O, barres noires).*

Chaque valeur représente la moyenne ± erreur standard, avec n = 3 lots de bourgeons axillaires distaux. L'étude de l'expression a été réalisée par RT-PCR quantitative en temps réel et la normalisation de l'expression a été réalisée par rapport au gène de référence EF-1α. L'expression génique juste après décapitation (T0) défini l'expression génique de base et possède une valeur arbitraire de 1. Les astérisques indiquent les différences significatives par rapport à la condition obscurité pour le même temps ($p<0,05$).

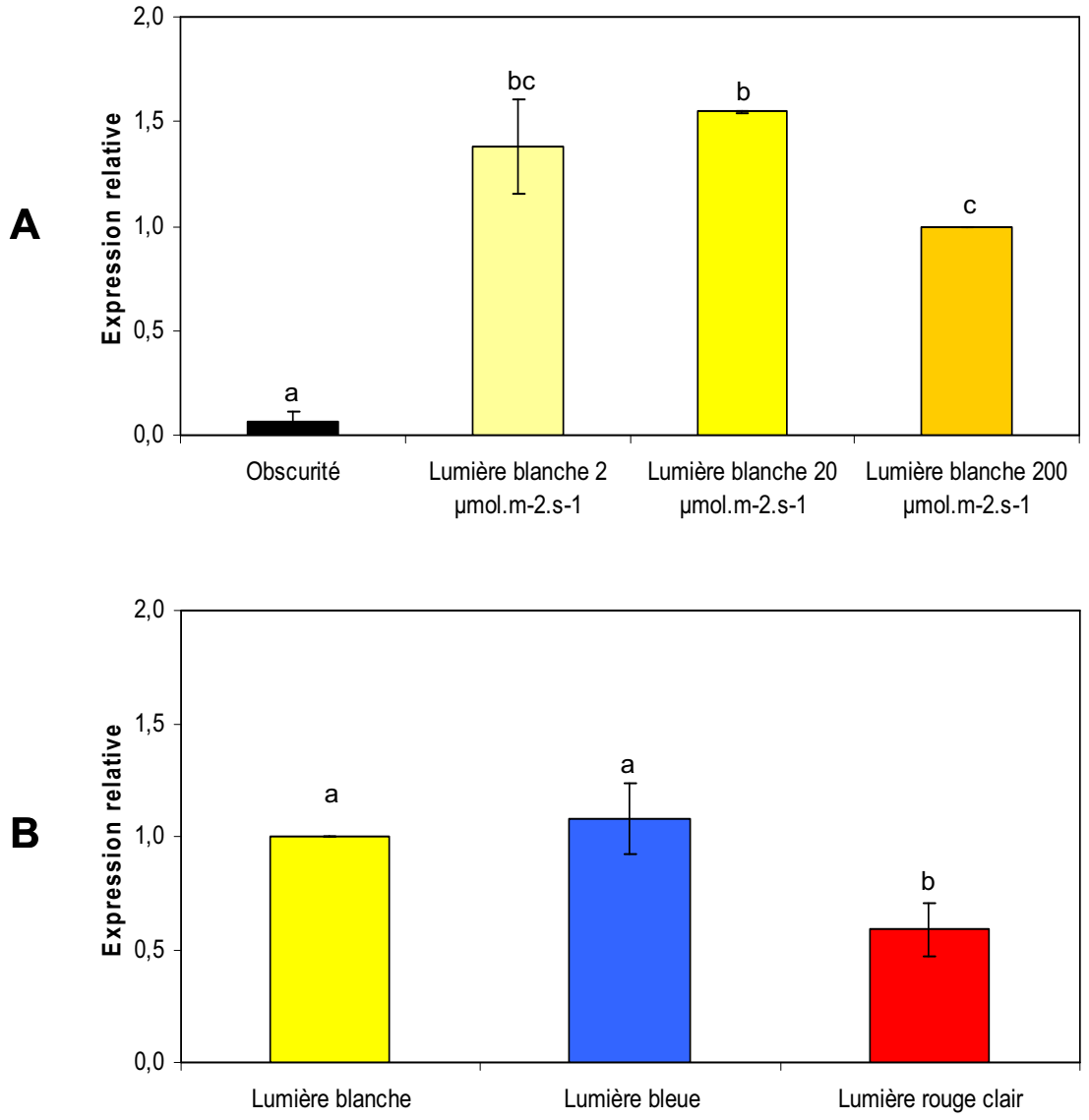


Figure 62 : *Expression du gène RhEXP dans les bourgeons axillaires distaux de plantes expérimentales Rosa hybrida 'Radrazz' cultivées pendant 72 h sous A) différentes quantités de lumière blanche (0, 2, 20 et 200 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h) et sous B) différentes qualités de lumière (lumière blanche, lumière bleue et lumière rouge clair, 20 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h/24h).*
Chaque valeur représente la moyenne ± erreur standard, avec n = 3 lots de bourgeons axillaires distaux. L'étude de l'expression a été réalisée par RT-PCR quantitative en temps réel et la normalisation de l'expression a été réalisée par rapport au gène de référence EF-1α. Pour A, l'expression génique à 200 *µmol.m^{-2}.s^{-1}* défini l'expression génique de base et possède une valeur arbitraire de 1. Pour B, l'expression génique de base est définie par l'expression obtenue sous lumière blanche. Les lettre indiquent les différences significatives entre chaque condition ($p<0,05$).

Tableau X : *Principaux éléments cis-régulateurs identifiés dans la région promotrice du gène RhEXP.*
Le logiciel PLACE a été utilisé (http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/index.html).

Nom et séquence du motif	Localisation sur le brin (+/-)	Rôles	Auteurs
CIACADIAN LEHLC (CAANNNATC)	1841 (-) et 1352 (+)	Séquence permettant une régulation circadienne de l'expression.	Piechulla *et al.* , 1998
GATA box (GATA)	1780, 1627, 1622, 1354, 1334 (-) 1139, 1127, 982, 928, 699 (-) 182, 135, 116, 101 (-) 1861, 1827, 1594, 1539, 875 (+) 868, 564, 539, 484, 178 (+)	Impliquée dans la régulation par la lumière et jouerait un rôle dans l'expression tissulaire spécifique.	Gilmartin *et al.* , 1990 Reyes *et al.* , 2004
GT1 consensus (GRWAAW)	1782, 1663, 1356, 1147, 718 (-) 707, 701, 506, 103 (-) 1822, 1714, 1594, 1255, 761 (+) 412, 390, 178, 7, 6 (+)	Séquence retrouvée dans beaucoup de gènes régulés par la lumière, site de liaison du facteur nucléaire GT-1 qui stabilise le complexe d'initiation de la transcription.	Terzaghi & Cashmore, 1995 Villain *et al.* , 1996 Le Gourrierec et al., 1999
IBOXCORE (GATAA)	1781, 1355, 1140, 1128 (-) 700, 102 (-) 1594, 178 (+)	Séquence conservée dans les promoteurs de gènes régulés par la lumière, chez les monocotylédones et les dicotylédones.	Terzaghi & Cashmore, 1995
REALPHALGLHCB21 (AACCAA)	1907 (-)	Site de liaison d'un répresseur de la transcription présent à l'obscurité et régulé par le phytochrome.	Degenhardt & Tobin, 1996
SORLIPZAT (GGGCC)	90 (-)	Impliquée dans la régulation de l'expression par le phytochrome.	Hudson & Quail, 2003

```
                                TGGCTGATTTGGTTTTTGACACCACGGCCCTTTGCTCTTTCTT -1916

TTTGTAATAGAGATAGTTTGAGTCTGATTTTTTTGTGTTCTCATAGATATGGTAATGATTTACTTTGCAGGA -1801

TTTTTAGAACCTCGGCTTTTTATCTAAACTTTGCTCCTTGCTTTCAAAATTCTTCTTTTACATTGTTCACAT -1729

TCAAGTGCCTTTTTGAAAATACTACTTTAGATTGCAGGGAGAGATTCCAAGTTCCATAGCTCTTAATTACCT -1657

AAATGTCTGCTAGCTTTTGCGAGAATCCATATCATATCTGATTCTAATAAACTCAGGGGTCAGATAAAGGGT -1585

GGTGAAGACTGAATCACATTTTAGACCCACCAGATTTCGTTCAAAGATACGCTGTTTTCACCTCTCTGGCTA -1513

ACTACTGGACAAGGATCGGAGCTAGCTTTCCATTATTTATGAACTTGGAGTCTCAAATCTAAGCAGAGATGC -1441

AGACTAAAGTTCTGGTGACATAAAGGTAGAAGAGTAGAAGACAACCACATGACCACTTAGCAAAATGGTTGT -1369

CCGGTAGTCCCCATTATCATGCATTGGACAAGGCTATCGTTACCCTATAACGGAAACAGACAACGGTATAGC -1297

CCCAATATTTTTACATTTTTAAAAAAGTATAATTGGGGATTGGTAAAGTCCAAACAAACTAGTAATGAAAAC -1225

TTATACACGAGACGACATCTATTAATTGATGTAAAATTACTTGACACACAGTTAACTTTTATGTCTTAATTT -1153

ATTTAAAATGATTTATCGAACATCTTATCTTCATCAATACTTTCCTCGATCATTCCCATGTACTCGTTTATA -1081

AAGCTGGCAACACTGGAGTTAATGATCAGCAACATGAAATGTAGATTTAAAGGCACCCACTCTCTGTCTCTG -1009

AGTTTGGCATGTAATAAATGAGAGTGTATCTTTCTCCAAGCCAGAGATTATAATACCGTGGAACCTTATGCA  -937

TGTGCTACTATCCCATCAATGTTTGGCCATGAATGACATTTATTTAAAATCTTGTTATGTAGATACTAGATA  -865

CTAAATAGATGAAAACTTTGATGCCATACTTTGCAGGCAGTACAAATTGAAGATTGGAGTTGCGTGATTTAC  -793

AACCACAAGAACTGCTTTCCATTAATTAAGAGAAAATCCCAACAGGGGTCAGGGAATAAACAATAAAGTCTA  -721

GTATTTTCTAAAATTTACCATTATCATTGGTGTTAGCTTAATATGACTTGTCCGAGGATTCCCTCACAATTG  -649

AAATCTTTTTAACACAGTTATTGTCCAACTTGGGAGCAAAACGTTGTTTGCAAGAGGTTTTGAGTTCGAACC  -577

CTTCGTCTCCATGATATTTAGTTGAGAGTGTTAACTTGATATACATTGTTTCTTAATCTAAGTATTATATAT  -505

TTCCTCTCAATTGAGAGGTTGATATCTTCTAGTTAGTTGAGCTGGTTGAGCCAAATTTACTCTGCCATCTTC  -433

ATAGACACTTTGGGGTTCATGGAAATTGCTAGACGGAAACTTGAAAATTAACCACGCGGTTTGAACCATGAA  -361

AACCGCTCAGTCCCAAAACTAATACCATGCATGCATTGATTCCTATTTCTACAGAGAAATGAGAGTCCCAAA  -289

ACCACTTAGCAGAGAGTTGCTTGGTCCCAACTCCCAACAGCTCAAGCTTTGTCAGGTTGTCAATTCAGGGGT  -217

GATGTTGACTGACCTCTATTTATTCTTCTTCAAAAAATGATAAAACCCCCCCTCTCCATTTCTTCACCACTG  -145

CTTAGTTCATATCTCCTGTAAATAGTTCTATCTCTGCCCTTTTTATCTTGTAGCAGAAGAATAAATTAGATT   -73

ATTTGGTACTACTTTGTACTAGCTATAATAGTGATGCTAAAAGAGTTCACAAATCTTACAATGCAGGAAAAA    -1

 M   A   S   L   G   I   L   L   I   G   F   V   S   M   L   S   S   V      18
ATG GCT TCT TTG GGG ATT CTT CTA ATT GGG TTT GTG TCT ATG CTC TCT TCT GTT     54

 N   C   Y   Y   Y   A   G   W   S   N   A   H   A   T   F   Y   G   G      36
AAT TGC TAT TAT TAT GCT GGT TGG TCC AAT GCT CAT GCA ACC TTC TAT GGA GGT    108

 G   D   A   S   G   T   M   G                                              44
GGT GAT GCT TCT GGG ACT ATG GGT  ATGTCTTCCACACAATGATTATAATCGAACTTTTACTTT   171
```

```
GGTTTTGTGAGCTTAATCTACATTGTTCTCTCATTTTCCAACTATTTTCCATAGTTGTCTAACATGGTATAT   243

CCGAAACTTGTTAGCTTGAGCTTGGTTTCAAGGTTAAAATGGTTTATTTTGTGTAAAGGATTGAACTTTGGT   315

                                                G   G   A   C   G   Y   G     51
TCTATTACTGTACTCATTAGTATTTTTGGGCTTGATTTTTACAGGT GGG GCT TGT GGC TAT GGA    379

 N   L   Y   S   Q   G   Y   G   T   N   T   A   A   L   S   T   A   L     69
AAT CTA TAC AGC CAA GGC TAT GGG ACT AAC ACA GCA GCT CTA AGC ACT GCT TTG   433

 F   N   N   G   L   T   C   G   A   C   Y   E   L   R   C   V   N   D     87
TTC AAC AAT GGC TTG ACT TGT GGA GCA TGT TAT GAG CTC AGG TGT GTA AAT GAC   487

 P   Q   W   C   L   P   G   T   I   V   V   T   A   T   N   F   C   P    105
CCA CAG TGG TGC CTC CCT GGC ACC ATT GTG GTC ACT GCC ACA AAC TTC TGC CCG   541

 P   G   G   W   V   P   P   S   A                                        114
CCG GGG GGA TGG GTG CCA CCC TCC GCA                                       568
```

Figure 63 : *Séquences nucléotidique et protéique du gène RhEXP issu du criblage de la banque génomique de Rosa hybrida 'Radrazz'.*
La séquence protéique est représentée au dessus de la séquence nucléique. Le codon ATG est représenté en rouge. La séquence de l'intron (226 pb) est représentée en bleu. Une séquence caractéristique des boîtes TATA a été trouvée 74 pb avant le codon ATG (motif TTATTT souligné en noir.

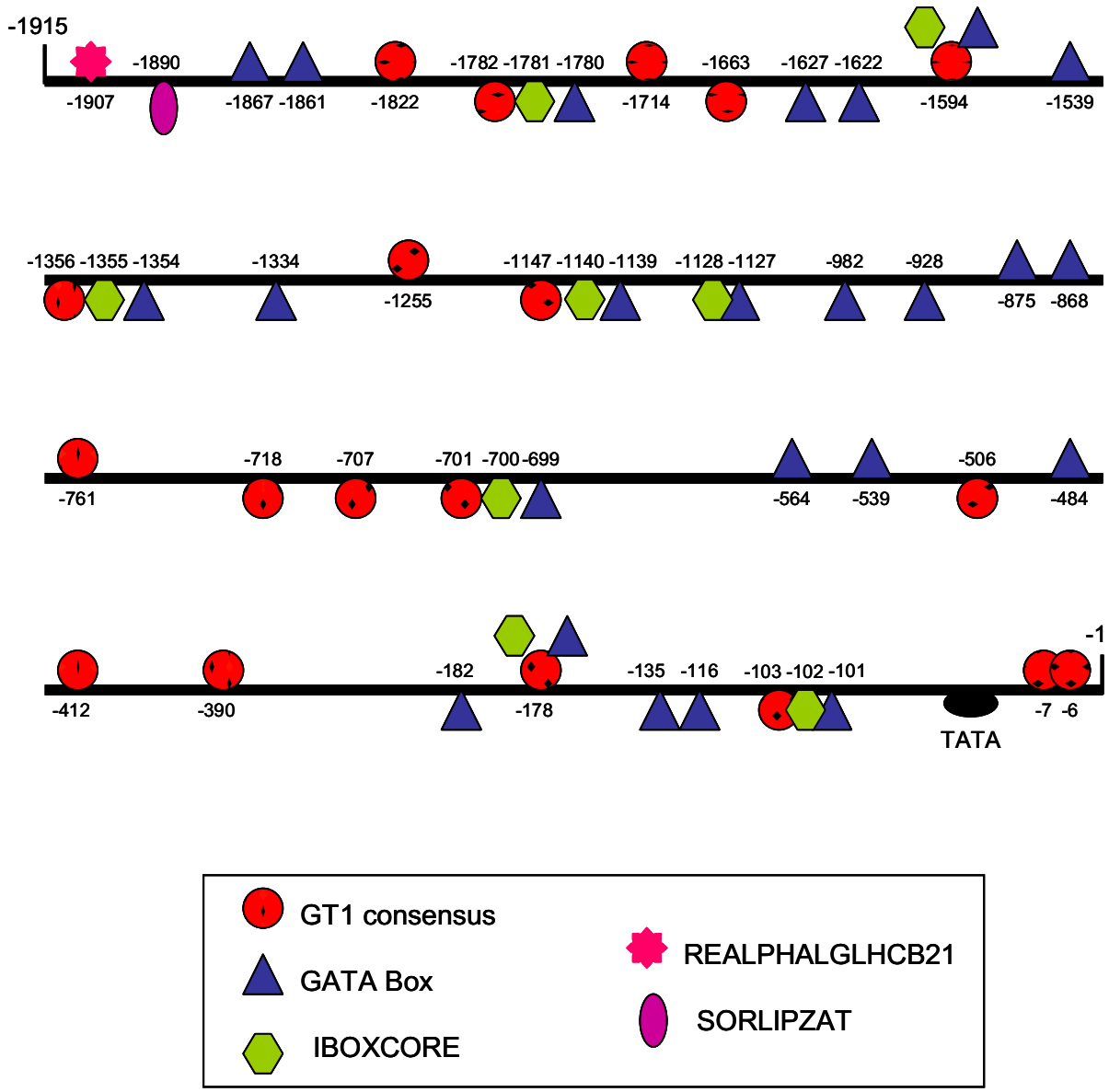


Figure 64 : *Emplacement de certains éléments cis (identifiés par analyse informatique) sur le promoteur du gène RhEXP10 de 1,915 kb.*
Les positions des motifs sont indiquées à partir du site d'initiation de la traduction. Les éléments situés sur le brin positif ou négatif sont respectivement placés au-dessus ou en-dessous de la ligne.

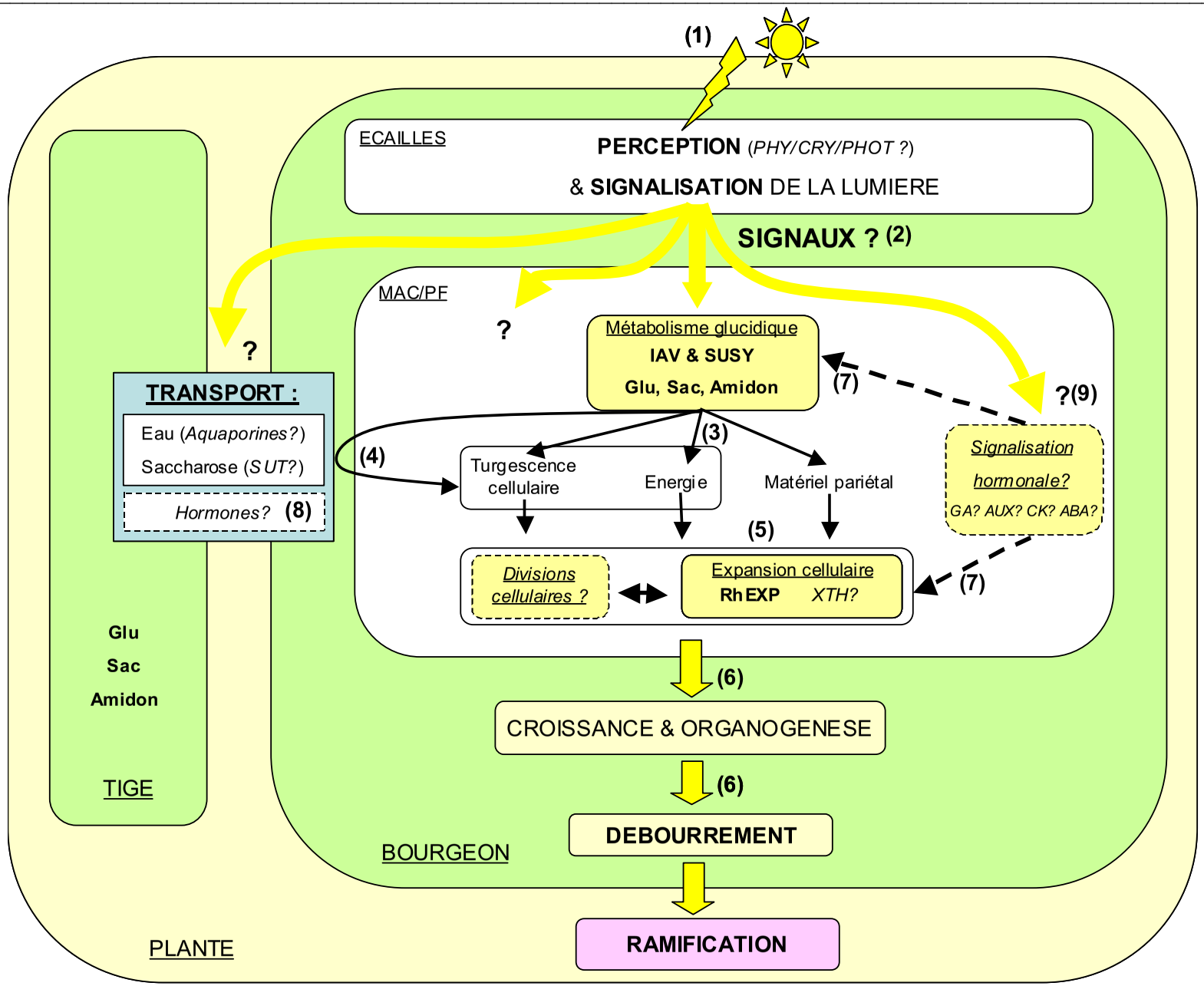

(1)
ECAILLES
PERCEPTION (PHY/CRY/PHOT ?)
& SIGNALISATION DE LA LUMIERE
SIGNAUX ? (2)
MAC/PF
?
Métabolisme glucidique
IAV & SUSY
Glu, Sac, Amidon
(7)
?(9)
?
TRANSPORT :
Eau (Aquaporines?)
Saccharose (SUT?)
Hormones? (8)
(4)
(3)
Turgescence cellulaire
Energie
Matériel pariétal
Signalisation hormonale?
GA? AUX? CK? ABA?
(5)
Divisions cellulaires ?
Expansion cellulaire
RhEXP XTH?
(7)
Glu
Sac
Amidon
TIGE
(6)
CROISSANCE & ORGANOGENESE
(6)
DEBOURREMENT
BOURGEON
RAMIFICATION
PLANTE

Figure 65 : *Modèle du photocontrôle du débourrement.*
La lumière (spectres bleu et rouge clair) utile au débourrement est perçue **(1)** par les photorécepteurs (PHY, CRY, PHOT ?) présents à la surface du bourgeon (écailles). Cette perception déclenche un (ou plusieurs ?) signal, peut-être de nature hormonale (Garcia-Martinez *et al.*, 1987 ; Penfield *et al.*, 2005 ; Oh *et al.*, 2006, 2007), qui est transmis aux autres organes du bourgeon **(2)** : les jeunes feuilles préformées (PF) et le méristème apical caulinaire (MAC). Au travers d'une chaîne de régulation génique, plusieurs processus physiologiques interdépendants sont alors induits : d'une part, un afflux de saccharose depuis la tige vers le bourgeon, et d'autre part, une dégradation de ce saccharose, en sucres simples, *via* la stimulation par la lumière de l'expression des gènes *IAV* et *SUSY* ainsi que des activités enzymatiques associées. Ces sucres simples, source d'énergie et de précurseurs pariétaux **(3)** vont permettre le développement et la croissance nécessaires au débourrement. Par leur pouvoir osmotique, ces sucres vont aussi provoquer un afflux d'eau **(4)**, soutenu dans le temps, qui va contribuer à augmenter la turgescence des cellules, nécessaire à leur élongation. L'activité de protéines, impliquées dans le relâchement pariétal et dont la synthèse est favorisée à la lumière (expansines, autres ?) va alors favoriser l'intégration des constituants élémentaires de la paroi (notamment l'UDP-glucose, dérivé du clivage du saccharose) **(5)**. La croissance cellulaire qui en résulte, associée aux divisions, va alors permettre la production de nouveaux primordia foliaires au sein du méristème, ainsi que la croissance hors du bourgeon des feuilles préformées, menant ainsi au débourrement **(6)**.

A l'obscurité, aucun afflux d'eau ni de sucres n'est observé, de même, la dégradation du saccharose est limitée par la faible expression des gènes *IAV* et *SUSY*. L'expression de gènes de relaxation pariétale (*RhEXP*) est réprimée, n'autorisant pas l'élongation cellulaire nécessaire à l'organogenèse. Aucun débourrement n'est observé. En réponse au stress provoqué par cette obscurité permanente, la transcription du gène *NAD-SDH* est fortement stimulée, permettant la synthèse de sorbitol, sucre-alcool contribuant à la survie cellulaire (Morais de Sousa *et al*., 2008).

Des interactions fortes avec les signalisations hormonales ont vraisemblablement lieu tout au long de ce processus, si ce n'est dans la transmission du signal lumineux (Garcia-Martinez et al., 1987 ; Penfield et al., 2005 ; Oh et al., 2006, 2007 ; Josse et al., 2008) **(2)***, nécessairement dans les processus de croissance et d'organogenèse (Gubler et al., 1995 ; Kaneko et al., 2002 ; Kim et al., 2005 ; Arana et al., 2006 ; de Lucas et al., 2008)* **(7)***. De plus, un contrôle du transport* **(8)** *et de la signalisation des hormones (notamment auxine) par la lumière* **(9)***, comme décrit dans d'autres systèmes biologiques (Colon-Carmona et al., 2000 ; Canamero et al., 2006 ; Nagashima et al., 2008), n'est pas à exclure dans le cas du débourrement.*

Abréviations : PHY, Phytochromes ; CRY, Cryptochromes ; PHOT, Phototropines ; IAV, Invertase acide vacuolaire ; SUSY, Saccharose synthase ; NAD-SDH, Sorbitol déshydrogénase NAD-dépendante ; Glu, Glucose ; Sac, Saccharose ; RhEXP, Expansine ; XTH, Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase ; SUT, Transporteur de saccharose ; GA, Gibbérellines ; ABA, Acide abscissique ; AUX, Auxine ; CK, Cytokinines.