



HAL
open science

Caractérisation fonctionnelle des gènes homologues de CYCLOIDEA identifiés chez *Aquilegia coerulea* 'Origami'.

Celine Ridel

► **To cite this version:**

Celine Ridel. Caractérisation fonctionnelle des gènes homologues de CYCLOIDEA identifiés chez *Aquilegia coerulea* 'Origami'. 2011, 190 p. hal-01204159

HAL Id: hal-01204159

<https://hal.science/hal-01204159>

Submitted on 6 Jun 2020

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.

CONSERVATOIRE NATIONAL DES ARTS ET METIERS
PARIS

Mémoire
présenté en vue de l'obtention
du DIPLOME d'INGENIEUR CNAM

Spécialité : Sciences et techniques du vivant
Option : génie biologique

par
Céline RIDEL

**Caractérisation fonctionnelle des gènes homologues de
CYCLOIDEA identifiés chez *Aquilegia coerulea* 'Origami'**

soutenu le 17 Mars 2011

Jury :

Ali SAIB	Professeur, CNAM	Président
Alessia ZAMBORLINI	Maître de Conférences, CNAM	Tuteur CNAM
Catherine DAMERVAL	Directeur de Recherches, CNRS	Responsable de stage
Patrick LAUFS	Directeur de Recherches, INRA	Responsable de stage
Matthieu FALQUE	Ingénieur de Recherches, INRA	Examinateur
Sophie NADOT	Maître de Conférences, Université d'Orsay	Examinateur

Remerciements

Je voudrais tout d'abord dire un grand merci à Catherine Damerval pour m'avoir fait confiance en me proposant ce sujet de stage passionnant et à Patrick Laufs pour m'avoir accueillie dans son équipe. Vous avez su vous rendre disponibles chaque fois que j'en avais besoin et vous avez été d'une grande gentillesse tout au long de mon stage et plus particulièrement lors de la rédaction de ce manuscrit et de la préparation de la soutenance, merci beaucoup!

Je souhaite remercier Matthieu Falque, Sophie Nadot, Ali Saib d'avoir accepté de faire parti de mon jury et particulièrement Alessia Zamborlini qui a bien voulu remplacer Fabien Magne afin que je soutienne au mois de Mars.

Je remercie Fabien Magne d'avoir eu la patience de répondre à tous mes mails, parfois peu explicites ou redondants.

Merci à Matthieu Falque pour m'avoir « prêtée » à l'équipe de Catherine le temps du stage et pour avoir accepté que je continue ce projet une fois revenue dans ton équipe.

Un grand merci à toutes les personnes que j'ai croisées à Versailles et qui ont contribué à ce que je m'y sente bien. Tout d'abord merci aux membres de l'équipe de Patrick pour leur accueil et leur gentillesse : Alice, Anne, Bernard qui est devenu « accro » aux mots fléchés par ma faute et Halima qui m'a initiée aux hybridations in situ (même si finalement je n'ai pas eu le temps d'en faire pour mon stage) et aux « ragots Versaillais ».

Un grand merci à Hervé qui a si bien su prendre soin de mes plantes en serre et qui été aussi curieux que moi de voir les phénotypes apparaître jour après jour.

Je remercie Adeline, Brice, Charlotte (Chacha65 pour les « intimes »), Eric qui a résolu mes soucis de disparitions de l'appareil photo, Jean-Christophe, Jean-Denis, Jonathan, Lionel, Line, Maité, Néro, Véronique et Yannick pour tous les bons moments passés en votre compagnie.

Bien sur je n'oublie pas de remercier les mouloniens qui ont été présents depuis le début de mon aventure CNAM : Clémentine, qui a été d'une patience exemplaire, d'une grande

gentillesse lors de la rédaction de mon mémoire de probatoire et sans laquelle je n'aurais peut-être pas réussi à le rendre. Merci à Hélène, dont les cours de gym m'ont permis de me défouler (même si je n'ai pas toujours été très assidue), Marpie, qui m'a remotivée chaque fois que le courage m'a manqué pour aller en cours. Tu as été l'exemple à suivre puisque tu as brillamment réussi ton diplôme d'ingénieur CNAM (encore félicitation pour ta prestation orale, tu as réussi à rester sérieuse face à certaines questions...chapeau !). Je remercie aussi Thierry qui m'a plusieurs fois « sauvée » en réparant mon pc et qui a vainement tenté de m'expliquer l'art de la programmation et Agnès qui m'a fait réviser le LSF pendant la pause déjeuner ou dès que l'occasion se présentait (d'ailleurs il va falloir que je m'y remette sérieusement). Et bien sur merci à toutes les personnes avec lesquelles j'ai travaillé, discuté, rigolé : Aurélie, Delphine, Domé, Fabrice, Julie, Laetitia, Marlène, Martine, Maud, Sylvie, Thibault, les Valérie.

Pour finir, je tiens à remercier mes amis et ma famille qui m'ont soutenue et encouragée toutes ces années. Vous m'avez pardonné mon manque d'enthousiasme et mes absences pour cause de révision, rédaction, grosse fatigue, petites déprimés... Je sais que vous serez là aussi pour fêter ma réussite. J'en connais même qui ont prévu de fêter ça même en cas d'échec...certains sont prêt à tout pour boire du Vouvray ! ☺

Les personnes que j'ai citées m'ont soutenue et beaucoup aidée au cours de ces années de cours du soir mais il en est un qui a le mérite particulier d'avoir subi au jour le jour les effets de la rédaction de ce mémoire. Yves, tu as supporté ma mauvaise humeur, mes « râleries », mes découragements, mes crises de fainéantises, etc... Mieux encore tu as tout fait pour m'aider à les surmonter. Tu as su me donner confiance en moi (il y a encore du travail mais c'est déjà bien mieux qu'avant) et en mes capacités pour mener à bien ce stage. Je n'ai pas de mot pour exprimer ce que je te dois alors je dirais simplement « merci ».

Il n'est pas facile de faire un bilan sur 6 ans d'étude et d'être sûre de n'oublier personne, alors merci aussi à ceux que j'aurai eu la maladresse d'oublier de citer ici.

Curriculum vitae

Mlle RIDEL Céline
4 bis place des sablons
91430 IGNY

Tél : 06.07.29.38.26
Courriel : ridel@moulon.inra.fr

Née le 5 Juillet 1977 à Amboise (37), France.

DIPLOMES et FORMATIONS

- Depuis 2004 Préparation au diplôme d'Ingénieur spécialité Sciences et Techniques du vivant option Génie Biologique
Conservatoire National des Arts et Métiers, Paris, France
- 1998 Brevet de Technicien Supérieur en Biotechnologie option Génie Biologique
Lycée de la vallée de Chevreuse, Gif sur Yvette, France

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

- Depuis 2001 **Technicienne biologiste titulaire**, INRA, UMR de Génétique Végétale du Moulon, Gif sur Yvette.
- 2000-2001 **Technicienne biologiste** (CDD de 12 mois), EZUS, détachée à l'INRA, UMR de Génétique Végétale du Moulon, Gif sur Yvette.
- 1999-2000 **Technicienne biologiste** (CDD de 11 mois), INRA, Station de Génétique et Amélioration des Plantes, Versailles.

COMPETENCES

Biologie cellulaire et moléculaire : culture *in vitro*, GUS, extraction d'ADN, d'ARN, PCR, RT-PCR, PCR quantitative, électrophorèse en gels d'acrylamide, clonage, génotypage SNP, microsatellite, RFLP, SSAP, *Virus Induced Gene silencing* (VIGS), bases en hybridation *in situ*.

Analyses de données : alignement de séquences avec les logiciels Staden et Bioedit, bases en analyses statistiques sous R.

Encadrements : stagiaires, CDD et nouveaux arrivants (français et étrangers) : formations aux manipulations de biologie moléculaire et aux règles de sécurité du laboratoire.

Langue : Anglais bulat niveau 3, langage des signes (LSF) niveau A1.3.

Responsabilités : Correspondante qualité de l'unité. Sauveteur secouriste du travail

PUBLICATIONS

Articles dans des revues à comité de lecture:

Drouaud J, Marrocco K, Ridel C, Pelletier G, Guerche P (2000). A Brassica napus skp1-like gene promoter drives GUS expression in Arabidopsis thaliana male and female gametophytes. *Sex. Plant Reprod.*, 13 : 29-35.

Falque, M., Décousset L., Dervins D., Jacob A.M., Joets J., Martinant J.P., Raffoux X., Ribière N., Ridel C., Samson D., Charcosset A. & Murigneux A. (2005) Linkage mapping of 1454 new maize candidate gene loci. *Genetics* 170: 1957-1966.

Durand E., Tenaillon M. I, Ridel C., Coubriche D., Jamin P., Jouanne S., Ressayre A., Charcosset A. and Dillmann C. (2010). Standing variation and new mutations both contribute to a fast response to selection for flowering time in maize inbreds. *BMC Evolutionary Biology* 10:2.

Communications et posters:

Falque M., Décousset L., Murigneux A., Dautrevaux N., Dervins D., Jacob A.M., Ribière N., Ridel C., Albin G., Joets J., and Charcosset A. (2003). Large-scale Maize cDNA mapping for candidate gene approach. Poster *45th Maize Genetics Conference*, March 13-16, Lake Geneva (WI)

Décousset L., Falque M., Ribière N., Dautrevaux N., Dervins D., Jacob A.M., Ridel C., Murigneux A. (2004). Maize EST Genetic Mapping within "Genoplante Maize Programme". *Plant Genomics European Meeting*, Lyon.

Falque M., Décousset L., Dervins D., Jacob A.M., Joets J., Martinant J.P., Raffoux X., Ribière N., Ridel C., Samson D., Charcosset A. & Murigneux A. (2005). Linkage mapping of 1454 new maize candidate gene loci. *47th Maize Genetics Conference* March 10-13, 2005 , Lake Geneva WI.

Raffoux X., Ridel C., Falque M. (2006). SNP genotyping using allele competitive PCR (AC-PCR). Poster, *Plant and Animal Genome Conference*, San Diego CA, January 14-18, 2006.

Falque M., Décousset L., Dervins D., Jacob A.M., Joets J., Martinant J.P., Raffoux X., Ribière N., Ridel C., Samson D., Charcosset A. & Murigneux A. (2006). Linkage mapping of 1454 new Maize candidate gene loci. Poster, *Plant and Animal Genome Conference*, San Diego CA, January 14-18, 2006.

Raffoux X., Ridel C., Falque M. (2006). SNP genotyping using allele competitive PCR (AC-PCR). Poster, *48th Maize Genetics Conference* March 9-12, 2006 , Pacific Grove, CA.

Falque M., Décousset L., Dervins D., Jacob A.M., Joets J., Martinant J.P., Raffoux X., Ribière N., Ridel C., Samson D., Charcosset A. & Murigneux A. (2006). Linkage mapping of 1454 new Maize candidate gene loci. Poster, *48th Maize Genetics Conference* March 9-12, 2006 , Pacific Grove, CA.

Durand E., Dillmann C., Tenaillon M., Ridel C., Coubriche D., Jamin P., Jouanne S. et Charcosset A. (2007). Sélection divergente pour la précocité de floraison dans deux lignées pures de maïs. *Petit Pois déridé*, Poitiers, Août 2007

Sarilar V., Ridel C., Rousselet A., Falque M., Letanneur J.-C., Eber F., Chèvre A.-M., Brabant P. and Alix K. (2008). What is the impact of allopolyploidy on transposable elements? A structural approach on newly synthesized *Brassica napus* allotetraploids. ICTE2008, *International Congress on Transposable Elements*. (April 20-23, Saint Malo, France).

Durand E., Dillmann C., Tenaillon M.I, Ridel C., Coubriche D., Jamin P., Jouanne S., Bertin P. et Charcosset A. (2008) Divergent selection for flowering time within maize inbred lines: role of mutation in adaptation. *Annual meeting of the society for molecular biology and evolution*, Barcelone, Juin 2008.

Sarilar V., Ridel C., Rousselet A., Falque M., Letanneur J.-C., Eber F., Chèvre A.-M., Brabant P. and Alix K. (2008) What is the impact of allopolyploidy on transposable elements? A structural approach on newly synthesized *Brassica napus* allotetraploids. *5th ISHS International Symposium on Brassica and 16th Crucifer Genetics Workshop* (September 8-12, Lillehammer, Norway).

Table des matières

Résumé	- 1 -
Introduction générale	- 2 -
Introduction bibliographique	- 4 -
<i>I. Les Angiospermes</i>	- 4 -
I.1. Définition et origine	- 4 -
I.2. Arbre phylogénétique simplifié	- 4 -
<i>II. La fleur</i>	- 5 -
II.1. Définition et composition	- 5 -
II.2. Contrôle génétique de l'identité florale	- 7 -
II.2.1. Le modèle ABC	- 7 -
II.2.2. Les modifications du modèle ABC	- 9 -
II.2.3. Les gènes cadastraux	- 10 -
<i>III. La symétrie florale</i>	- 11 -
III.1. Types de symétries	- 12 -
III.2. Bases génétiques de la zygomorphie	- 12 -
III.2.1. Les facteurs de transcription TCP	- 12 -
III.2.2. L'espèce modèle <i>Antirrhinum majus</i> : le gène clé <i>CYCLOIDEA</i>	- 13 -
<i>IV. Etude de la zygomorphie chez les Renonculacées</i>	- 14 -
IV.1. Pourquoi choisir les Renonculacées ?	- 14 -
IV.2. Les gènes <i>RanaCyL</i>	- 15 -
<i>V. Virus Induced Gene Silencing ou VIGS</i>	- 16 -
V.1. Les petits ARN interférants	- 17 -
V.2. Principe du VIGS	- 17 -
V.3. Virus utilisés pour induire le VIGS chez les plantes	- 18 -
V.4. Le virus du rattle du tabac (TRV)	- 19 -
V.4.1. Description et réplication du virus TRV	- 19 -
V.4.2. Le TRV utilisé comme vecteur pour le VIGS	- 20 -
V.5. Avantages et inconvénients du VIGS	- 21 -
V.6. Chez quelles espèces d'eudicotylédones basales le VIGS a été utilisé?	- 22 -
<i>VI. Objectifs de mon stage</i>	- 23 -
Matériel et Méthodes :	- 24 -
<i>I. Matériel végétal et conditions de culture</i>	- 24 -
I.1. Culture des 'Origami'	- 24 -
I.2. Culture des <i>A alpina</i> , <i>N. damascena</i> et de <i>C. regalis</i>	- 24 -
<i>II. Souches bactériennes</i>	- 25 -
II.1. Souche d' <i>Escherichia coli</i>	- 25 -
II.2. Souche d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	- 25 -
<i>III. Caractérisation des gènes d'intérêt et clonage</i>	- 26 -
III.1. Extraction d'ADN et d'ARN des plantes	- 26 -
III.2. Amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) des différents gènes	- 26 -
III.2.1. Gène de l' <i>ANS</i> (<i>ANTHOCYANIDINE SYNTHASE</i>)	- 26 -
III.2.2. Gènes <i>TCP1</i> et <i>TCP2</i>	- 26 -
III.2.3. Gènes <i>PDS</i> d' <i>A. alpina</i> , de <i>N. damascena</i> et de <i>C. regalis</i>	- 27 -
III.3. Clonage dans pGEMT et transformation d' <i>E.coli</i>	- 27 -
III.4. Séquençage et validation des clones	- 28 -
III.5. Intégration des constructions dans les plasmides TRV2 ou TRV2- <i>ANS</i> et transformation d' <i>E. coli</i>	- 28 -
III.6. Séquençage et validation des clones	- 29 -

III.7.	Intégration des constructions dans les plasmides TRV2 ou TRV2-ANS et transformation d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	- 29 -
IV.	<i>Virus Induced Gene Silencing (VIGS)</i>	- 30 -
I.1.	Infiltration des plantes	- 30 -
I.1.1.	Culture des agrobactéries	- 30 -
I.1.2.	Méthodes d'infiltrations	- 30 -
I.2.	Culture des plantes en serre de niveau 3 de confinement	- 31 -
I.2.1.	Culture des 'Origami'	- 31 -
I.2.2.	Culture des <i>A. alpina</i> et <i>N. damascena</i>	- 32 -
I.3.	Phénotypage des plantes	- 32 -
I.3.1.	Définitions des simplifications de langage utilisées par la suite	- 32 -
I.3.2.	Fréquence des notations	- 33 -
I.3.3.	Protocole des notations	- 33 -
I.4.	Observations microscopiques	- 33 -
V.	<i>Analyse par RT-PCR semi-quantitative de l'expression des gènes d'intérêt</i>	- 34 -
V.1.	Prélèvements en serre	- 34 -
V.2.	Extraction des ARN totaux	- 34 -
V.3.	PCR semi-quantitative	- 34 -
VI.	<i>Analyses statistiques</i>	- 35 -
VII.	<i>Coûts du stage</i>	- 36 -
Résultats:		- 37 -
I.	<i>Inhibition des gènes TCP chez l'ancolie par la technique du VIGS</i>	- 37 -
I.1.	Obtention des séquences codantes des gènes <i>TCP</i>	- 37 -
I.2.	Réalisation et vérification des constructions	- 38 -
I.3.	Observations	- 39 -
I.3.1.	Fleurs des plantes témoins	- 39 -
I.3.2.	Fleurs des plantes infiltrées avec le tampon d'infiltration	- 39 -
I.3.3.	Effet du tampon sur le nombre d'organes	- 39 -
I.4.	Effet de l'inhibition des gènes <i>ANS</i> et <i>TCP</i> sur la morphologie florale	- 40 -
I.4.1.	Description des phénotypes observés	- 40 -
I.4.1.1.	Observation des fleurs entières	- 40 -
I.4.1.2.	Observations au microscope électronique à balayage (MEB)	- 40 -
I.4.2.	Description temporelle	- 41 -
I.4.3.	Comparaison des 2 techniques d'infiltration des plantes	- 42 -
I.4.4.	Effet sur le nombre d'organes totaux	- 42 -
I.4.5.	Effets sur le nombre d'organes dans les fleurs ANS+ et/ou avec phénotype	- 43 -
I.5.	Effet de l'inhibition des gènes <i>ANS</i> et <i>TCP</i> sur leur niveau d'expression	- 43 -
I.6.	Expression des gènes de la fonction B dans les plantes modifiées	- 44 -
I.7.	Test de l'hypothèse d'une contamination des plantes ANS	- 45 -
II.	<i>Extension méthodologique de la technique du VIGS</i>	- 45 -
II.1.	Application à d'autres Renonculacées	- 45 -
II.1.1.	Constructions et infiltrations	- 46 -
II.1.2.	Description des phénotypes observés	- 46 -
II.1.2.1.	Plantes témoins et plantes tampons	- 46 -
II.1.2.2.	Plantes infiltrées avec le plasmide TRV2 sans insert	- 46 -
II.1.2.3.	Plantes infiltrées avec le plasmide TRV2-PDS-Nd	- 47 -
II.1.3.	Effet de l'inhibition du gène <i>PDS</i> sur son expression	- 47 -
II.2.	Limites du VIGS	- 47 -
II.2.1.	Constructions et transformations	- 48 -
II.2.2.	Description des phénotypes observés	- 48 -
II.2.2.1.	Plantes infiltrées avec le plasmide TRV2-ANS-TCP1-TCP2	- 48 -
II.2.2.2.	Plantes infiltrées avec les plasmides TRV2-PDS	- 49 -
II.2.3.	Effet de l'inhibition du gène <i>PDS</i> sur son expression	- 49 -
Discussion		- 50 -

Conclusion	- 58 -
Annexes	- 59 -
<i>Annexe 1 : Conditions de culture des ancolies en chambre de vernalisation</i>	<i>- 60 -</i>
<i>Annexe 2 : Conditions de culture des ancolies en compartiment de quarantaine</i>	<i>- 61 -</i>
<i>Annexe 3: Protocole pour clonage de produit PCR dans E. coli</i>	<i>- 62 -</i>
<i>Annexe 4: Protocole d'extraction d'ADN plasmidique</i>	<i>- 64 -</i>
<i>Annexe 5: Préparation d'agrobactéries transformées pour la réalisation de VIGS</i>	<i>- 65 -</i>
<i>Annexe 6 : Protocole pour infiltration sous vide de plantes par agrobactéries transformées</i>	<i>- 66 -</i>
<i>Annexe 7 : Positionnement des fleurs sur une plante d' 'Origami'</i>	<i>- 71 -</i>
<i>Annexe 8 : Exemple de notations effectuées sur les ancolies</i>	<i>- 72 -</i>
<i>Annexe 9 : Protocole d'extraction des ARN totaux</i>	<i>- 73 -</i>
Références bibliographiques	74

Liste des abbréviations

° C	degré Celsius
<i>A. alpina</i>	<i>Aquilegia alpina</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
<i>A. formosa</i>	<i>Aquilegia formosa</i>
AG	AGAMOUS
Ago	protéine Argonaute
<i>A. majus</i>	<i>Antirrhinum majus</i>
ANS	ANTHOCYANIDINE SYNTHASE
ANSs-	plante ou fleur n'ayant pas le gène ANS inhibé
ANSs+	plante ou fleur ayant le gène ANS inhibé
<i>AP1, 2 et 3</i>	<i>APETALA1, 2 et 3</i>
APG II et III	classifications phylogénétiques des Angiospermes
<i>A. pubescens</i>	<i>Aquilegia pubescens</i>
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messager
ASLV	virus sphérique latent de la pomme (<i>Apple Spheric Latent Virus</i>)
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>Aq</i> ou <i>A. vulgaris</i>	<i>Aquilegia vulgaris</i>
BMV	virus de la mosaïque du brome (<i>Brome Mosaic Virus</i>)
BSMV	virus de la mosaïque striée de l'orge (<i>Barley Stripe Mosaic Virus</i>)
CaMV	virus de la mosaïque du chou-fleur (<i>Cauliflower Mosaic Virus</i>)
cm	centimètre
<i>Cr</i> ou <i>C. regalis</i>	<i>Consolida regalis</i>
CYC	CYCLOIDEA
CYC-like	gène homologue de CYC
db	double-brin
DEF	DEFICIENS
DCL	DICER-like (enzymes de la famille des DICER)
DICH	DICHOTOMA
DO	densité optique

dpi	jours après infection (« <i>day after infection</i> »)
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
iARN	interférence à ARN
IPTG	iIsoPropyl β -D-1-ThioGalactopyranoside
kb	kilobase
kg, g, mg, ng	kilogramme, gramme, milligramme, nanogramme
KV	kilovolt
L, mL, μ L	litre, millilitre, microlitre
LB	milieu Luria-Bertani
MADS	<i>MCM1</i> , <i>AG</i> , <i>DEF</i> et <i>SRF</i>
<i>MCM1</i>	<i>MINICHROMOSOME MAINTENANCE 1</i>
MEB	microscope électronique à balayage
MES	acide 2-[Nmorpholino]ethanesulfonic
MgCl ₂	magnesium chloride
MYB	<i>MYELOBLASTOSE</i>
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
<i>Nd</i> ou <i>N. damascena</i>	<i>Nigella damascena</i>
NOS	nopaline synthase terminator
nt	nucléotide
‘Origami’	<i>Aquilegia coerulea</i> ‘Origami’
pb	paire de base
<i>PCF</i>	<i>Proferating Cell Factor</i>
PCR	réaction de polymérisation en chaine (« <i>polymerase chain reaction</i> »)
PDS	phytoène désaturase
PDSs+	inhibition du gène <i>PDS</i>
<i>PI</i>	<i>PISTILLATA</i>
PVX	virus X de la pomme de terre (<i>Potato Virus X</i>)
<i>RAD</i>	<i>RADIALIS</i>
RDR ou RdRP	polymérase à ARN dépendant de l'ARN (« <i>RNA dependant RNA polymerase</i> »)
RISC	complexe effecteur de l'ARNi (« <i>RNA-Induced Silencing Complex</i> »)
RNAse	ribonucléase
Rpm	rotation par minute

RT-PCR	PCR après transcription inverse de l'ARNm en ADNc (<i>reverse transcriptase PCR</i>)
SEP1, 2, 3 et 4	<i>SEPALLATA 1, 2, 3 et 4</i>
SDS	dodécylsulfate de sodium
siARN	petit ARN interférent (« <i>siRNA: small interfering RNA</i> »)
<i>SRF</i>	<i>SERUM RESPONSE FACTOR</i>
<i>TBI</i>	<i>Teosinte branched1</i> du maïs
TCP	<i>TBI, CYC</i> et <i>PCF</i> : facteur de transcription
TE	tampon d'éluion
TMV	virus de la mosaïque du tabac
TRV	virus de <i>rattle</i> de tabac (<i>Tobaco Mosaic Virus</i>)
TRV-PDS	TRV modifié avec un fragment du gène de PDS
UV	ultra-violet
VIGS	extinction génique induite par un virus (« virus-induced gene silencing »)
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- beta-D-galactopyranoside

Caractérisation fonctionnelle des gènes homologues de *CYCLOIDEA* identifiés chez *Aquilegia coerulea* 'Origami'. Mémoire d'Ingénieur C.N.A.M., Paris 2011.

Résumé

La zygomorphie (ou symétrie bilatérale) est déterminée par l'interaction de 4 facteurs de transcription chez l'espèce modèle *Antirrhinum majus*. Le plus important est codé par le gène *CYCLOIDEA* (*CYC*) qui est exprimé dans la partie dorsale de la fleur, où il freine la croissance des organes. Des homologues du gène *CYC* ont été caractérisés chez 5 espèces de Renonculacées. Parmi ces espèces, l'ancolie (qui est actinomorphe) possède 2 gènes homologues de *CYC* qui s'expriment dans les boutons floraux. Les objectifs de mon travail ont été d'évaluer le rôle de ces gènes dans la morphologie florale et de préparer de futures expérimentations complémentaires à celle-ci. Pour cela, j'ai utilisé une méthode d'inactivation de gènes, le « VIGS » (*Virus Induced Gene Silencing*), que j'ai appliquée sur différentes espèces de Renonculacées. L'inhibition de l'expression des homologues de *CYC* n'a pas modifiée la symétrie florale de l'ancolie, mais elle semble entraîner des conversions homéotiques de sépales en pétales et d'étamines en pétales. Nous en avons déduit que, chez l'ancolie, ces gènes devaient jouer un rôle soit dans la régulation des gènes responsables de l'identité des organes floraux soit dans la limitation de leurs zones d'action. De plus, nous avons obtenu des résultats prometteurs sur les autres espèces testées.

Mots clés: *CYCLOIDEA*, symétrie florale, fleur, conversion homéotique, Ancolie, Virus Induced Gene Silencing (VIGS), TCP.

Summary

In *Antirrhinum majus* flower, zygomorphy (or floral bilateral symmetry) is determined by the interaction of 4 factors of transcription. The most important is coded by the *CYCLOIDEA* gene (*CYC*). *CYC* is expressed in the dorsal part of the flower, where it slows down the growth of organs. *CYCLOIDEA* homologs were characterized in 5 species of Ranunculaceae. Among these species, *Aquilegia* (which is actinomorphic) has 2 *CYC* homologous genes which are expressed in floral buds. The objectives of my work were to estimate the role of these genes in floral morphology and to prepare future complementary experiments. To do so, I used a method of gene silencing, the VIGS (*Virus Induced Gene Silencing*), that I applied to different species of Ranunculaceae. The silencing of the *CYC* homologs did not modify the floral symmetry of *Aquilegia* but it seems to result in homeotic conversions (sepals to petals and stamens to petals). We deduced that, in *Aquilegia*, these genes might play a role in the regulation of the genes determining the floral organs identities or in determining the limits of their action area. In addition, we obtained promising results on the others tested species.

Key words: *CYCLOIDEA*, floral symmetry, flower, homeotic conversion, *Aquilegia*, Virus Induced Gene Silencing (VIGS), TCP.

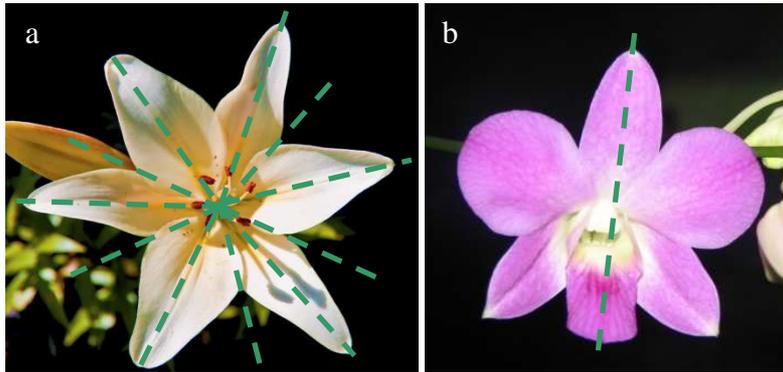


Figure 1: Illustrations des différents types de symétries.

a: Photographie de lys (symétrie radiale ou actinomorphe)

b: Photographie d'orchidée (symétrie bilatérale ou zygomorphe)

Les pointillés verts symbolisent les axes de symétrie possibles.

Introduction générale

Les fleurs présentent une variété étonnante de formes. Du point de vue de leur symétrie, elles peuvent toutes être classées en deux formes principales : celles à symétrie radiale (ou actinomorphic), comme le lys, et celles à symétrie bilatérale (ou zygomorphie), comme l'orchidée (figure 1). Les études de fleurs fossiles et de phylogénie ont montré que la symétrie radiale est l'état ancestral, alors que la symétrie bilatérale a évolué de nombreuses fois, et de façon indépendante, en des familles variées de plantes (Citerne et al., 2010). L'origine de la zygomorphie florale est probablement une conséquence de la sélection par la spécialisation de certains insectes pollinisateurs (Zhang et al., 2010).

Pourquoi la sélection naturelle favoriserait-elle la symétrie bilatérale ? Parmi les réponses avancées il y a le fait que les fleurs à symétrie bilatérale constitueraient une plate-forme d'arrivée idéale pour les insectes (Gomez *et al.* 2006) et qu'elles forceraient les insectes à s'approcher selon un angle particulier qui entraînerait un meilleur dépôt du pollen sur le corps de l'animal (Armbruster et al. 1994). La survie ou l'évolution de plus de 80 % des espèces végétales dans le monde et la production de 84 % des espèces cultivées en Europe dépendent directement de la pollinisation par les insectes. Et, réciproquement, certains insectes comme les abeilles ne peuvent survivre sans les fleurs. Ces fleurs leur offrent nectar, pollen, mais aussi huile, chaleur, parfum et leurre sexuel en échange du transport de leur pollen depuis les étamines productrices jusqu'aux stigmates du même ou d'un autre individu, permettant ainsi la fécondation. Le mutualisme qui les lie, a conduit à la coévolution et à la diversité des insectes et des fleurs (Citerne et al., 2010).

Les pétales peuvent avoir beaucoup de formes différentes ce qui contribue à la grande diversité des architectures florales actuelles. Il a été montré que la forme de ces pétales peut parfois évoluer en fonction du type de pollinisateur que la plante rencontre dans son environnement. C'est le cas, par exemple, chez le genre *Ruellia* (Tripp et Manos, 2008) ou le genre *Aquilegia* chez lequel le changement d'un pollinisateur abeille en un pollinisateur colibri correspond à l'allongement des éperons nectarifères des pétales (Hodges et Arnold 1995; Hodges 1997).

La sélection naturelle, en favorisant les phénotypes les plus adaptés, peut en partie expliquer les différentes architectures florales existantes mais des contraintes liées au développement de la fleur peuvent aussi jouer un rôle important. Afin de comprendre comment s'est passée la

diversification de la forme des fleurs au cours de l'évolution, il est nécessaire d'approfondir les connaissances sur les mécanismes qui entrent en jeu lors du développement floral et plus particulièrement les gènes qui permettent la mise en place des organes et avec eux la symétrie florale.

Après un rappel sur les angiospermes et plus précisément sur les caractéristiques de la fleur elle-même, je présenterai de façon plus détaillée ce qu'on sait des mécanismes génétiques qui permettent la création des différents organes floraux ainsi que les types de symétries qui existent. Une attention particulière sera apportée à la symétrie bilatérale et aux connaissances actuelles sur les gènes qui entrent en jeu dans sa mise en place. Je décrirai ensuite la technique qui est actuellement la plus rapide et fiable pour l'analyse fonctionnelle de gènes chez les espèces non modèles: l'inhibition de gène induite par virus ou « Virus Induced Gene Silencing » (VIGS). Enfin, je détaillerai les objectifs de mon stage.

Introduction bibliographique

I. *Les Angiospermes*

I.1. Définition et origine

Les Angiospermes, communément appelés plantes à fleurs, représentent environ 90% des espèces végétales terrestres avec plus de 260 000 espèces qui se répartissent aussi bien dans les zones tropicales, tempérées que dans les milieux aquatiques. Seules les zones froides sont laissées aux résineux et aux lichens. En grec, angiosperme signifie « graine dans un récipient » par opposition aux Gymnospermes (graine nue). Les angiospermes se distinguent des autres plantes à graines par la présence d'un ovaire, qui enveloppe les ovules, et qui se développera pour donner un fruit. Les organes reproducteurs sont condensés en une fleur. La fleur et le fruit, qui sont propres à ce groupe, nécessitent, pour de nombreuses espèces, une interaction avec les animaux nécessaire pour leur reproduction (pollinisation par les insectes, le transport des graines par les animaux...).

Les gymnospermes et les angiospermes ont divergés à partir d'un ancêtre commun il y a environ 300-350 millions d'années. Jusqu'ici aucune forme « ancestrale » d'angiosperme, permettant d'expliquer leur apparition « subite » au crétacé inférieur, n'a été découverte. En effet, le fossile de restes floraux le plus ancien jamais découvert est *Archaeofructus liaoningensis*. Il a été trouvé en Chine et daterait d'il y a 115 à 125 millions d'années (crétacé). Cependant, une étude récente basée sur des données moléculaires, montre que 5 grands groupes des angiospermes seraient apparus il y a 140 millions d'années (Moore et al., 2007). Au sein des Angiospermes, les eudicotylédons (ou eudicots) représentent environ 75% des espèces. Le record du plus vieux fossile de pollen trouvé indiquerait que les eudicotylédones sont apparus il y a 135 millions d'années soit peu de temps après l'origine des angiospermes eux-mêmes.

I.2. Arbre phylogénétique simplifié

Selon les classifications phylogénétiques des Angiospermes (APG II (2003) et APG III (2009)) basées sur des données moléculaires, le clade des Angiospermes comprend quatre

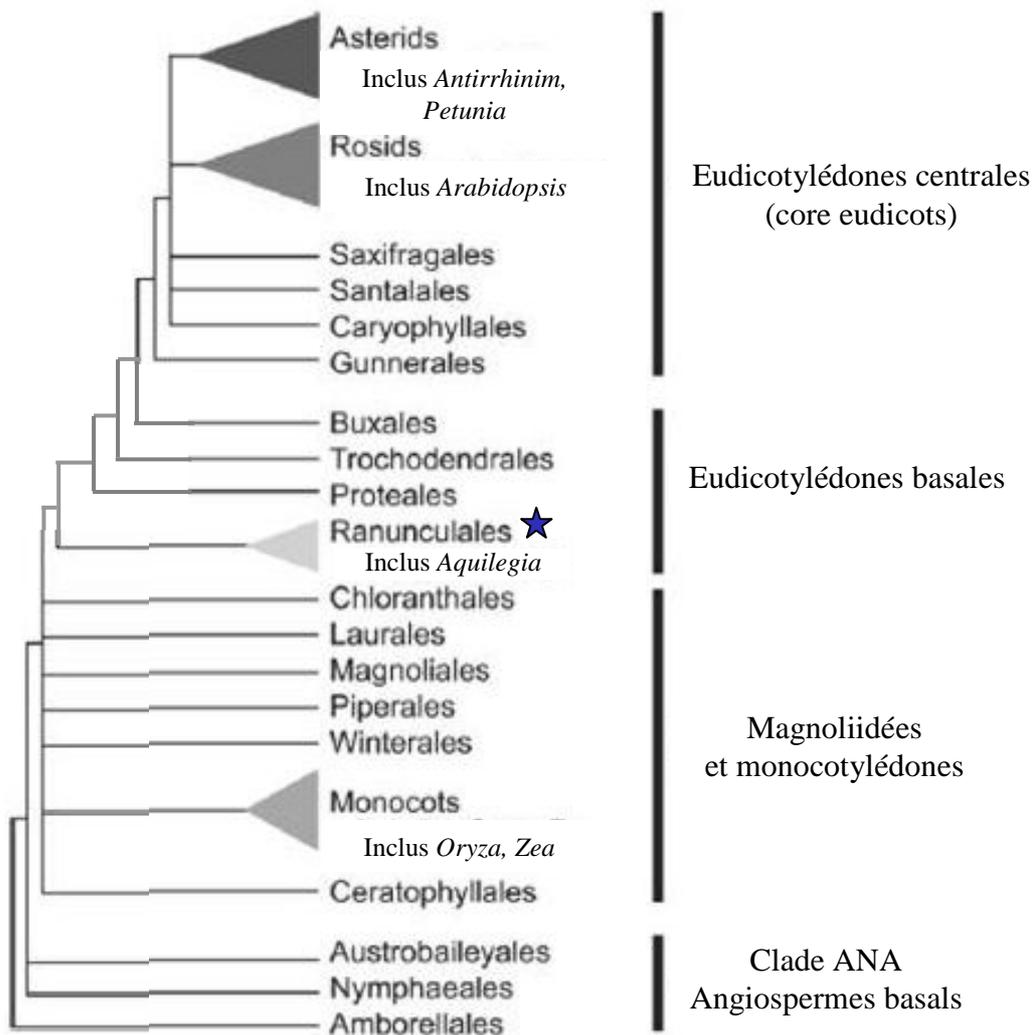


Figure 2: Arbre phylogénétique simplifié des Angiospermes (adapté de Soltis et al.2008). Cet arbre montre les relations évolutives entre les grands groupes d'angiospermes. ANA est un acronyme pour Amborellales, Nymphaeales et Austrobaileyales. L'étoile bleu indique l'ordre des *Ranunculales* qui sera détaillé dans la suite du manuscrit. (Kramer E., 2007)

grands groupes : les Angiospermes basales avec le grade des ANA (pour Amborellales, Nymphaeales et Austrobaileyales), les Magnoliidées, les Monocotylédones et les Eudicotylédones ou Dicotylédones vraies. Parmi les Eudicotylédones, il y a le clade des Eudicotylédones centrales ou core eudicots et le grade des Eudicotylédones basales, encore appelés eudicots basales, qui est constitué de 5 ordres : les Buxales, les Sabiales, les Trochodendrales, les Ranunculales et les Proteales (figure 2).

Le clade des Eudicotylédones centrales ou core eudicots dérive d'un ancêtre commun avec les eudicots basales. Les Eudicotylédones sont un groupe d'espèces végétales très présentes dans la plupart des écosystèmes terrestres, avec 200 000 espèces sur Terre. Un grand nombre est utile pour l'espèce humaine (plantes cultivées, par exemple ornementales). Elles se caractérisent par des feuilles le plus souvent pourvues d'un pétiole et montrant une nervation ramifiée et des grains de pollen à 3 apertures.

II. *La fleur*

II.1. Définition et composition

La fleur est généralement décrite comme la combinaison de structures reproductrices masculines et féminines, sur une tige très courte et entourée par des organes stériles, le périgone (Theissen et al. 2002; Bateman et al. 2006). Elle a pour fonction de permettre la reproduction de la plante qui l'a produite. L'éclosion des fleurs, ou floraison, est éphémère. Les fleurs sont parfois solitaires, mais souvent regroupées en inflorescences.

Les fleurs présentent des aspects extrêmement variés en fonction du nombre, de la taille et de la forme de leurs pièces florales. Les fleurs des eudicotylédones ont une symétrie d'ordre 4 ou 5 (5 étant le plus fréquemment trouvé) alors que les monocotylédones sont fondamentalement trimériques (3 sépales, 3 pétales, 2x3 étamines, 3 carpelles). La fleur typique des eudicotylédones centrales est constituée de quatre verticilles ou ensemble d'organes insérés soit en cercles concentriques soit en spirales sur un réceptacle floral. De l'extérieur vers l'intérieur, on trouve les verticilles, ou ensemble d'organes, suivants :

- Le calice : formé par l'ensemble des sépales. Il est souvent vert, mais peut aussi être coloré. Le calice évoque généralement par sa forme une clochette renversée, dont la fonction est de protéger le bouton floral.

- La corolle : formée par l'ensemble des pétales, elle est généralement la partie la plus voyante de la fleur. Le transport du pollen, et donc la fécondation, est facilité par l'attraction de pollinisateurs comme les abeilles par les couleurs et les formes des pétales. Chez certaines espèces de plantes à fleurs, les pétales possèdent une partie basale, plus ou moins conique, doté d'un organe appelé « nectaire » qui produit un liquide sucré, le nectar, qui est butiné par de nombreux insectes mais aussi, pour certaines espèces, par des chauve-souris nectarivores ou des oiseaux (colibri).

Il arrive que sépales et pétales ne soient pas discernables, on parle alors de tépales pour désigner les 2 organes (cas de la tulipe).

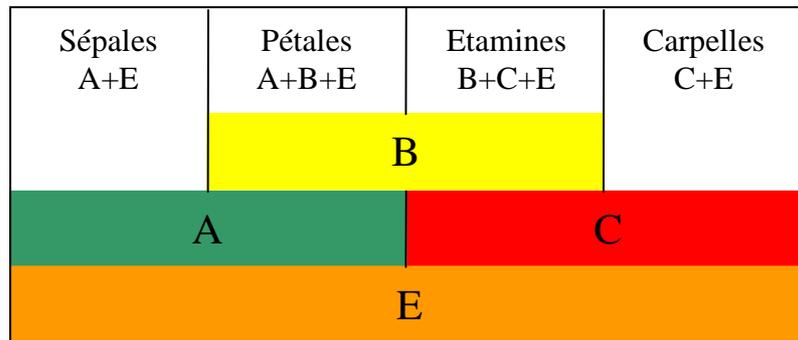
Calice et corolle forment le périanthe, enveloppe stérile, qui joue un rôle protecteur pour les organes reproducteurs et attractif pour les animaux pollinisateurs.

- L'androcée : formé par l'ensemble des étamines, il est l'appareil reproducteur mâle. Chaque étamine est constituée d'une partie effilée, le filet, et d'une partie renflée, l'anthère où est produit le pollen.
- Le gynécée (aussi appelé pistil): formé de l'ensemble des carpelles, il est l'appareil reproducteur femelle. Le gynécée est constitué d'un ovaire à la base, d'une partie effilée, le style, et enfin du stigmate qui réceptionne le pollen.

Après la pollinisation, la fleur est fécondée et l'ovaire se transforme en fruit contenant les ovules fécondés qui deviendront les graines.

La majorité des fleurs sont bisexuées ou hermaphrodites mais il existe des fleurs unisexuées (soit mâles soit femelles). Certaines plantes, comme le maïs, possèdent des fleurs mâles et femelles sur un même individu, on parle alors de monoécie. Dans ce cas, l'autofécondation est l'un des modes de fécondation possible. En règle générale la nature favorise plutôt la pollinisation croisée que l'autofécondation qui ne permet pas le brassage génétique. Pour cela, certaines plantes présentent des phénomènes d'auto-incompatibilité ou de décalage de maturité des fleurs mâles et femelles qui rendent impossible l'autofécondation. Chez d'autres espèces, comme le chanvre, les fleurs mâles et femelles se forment chez des individus différents, on parle alors de dioécie. Dans ce cas, la fécondation est obligatoirement croisée.

a



b

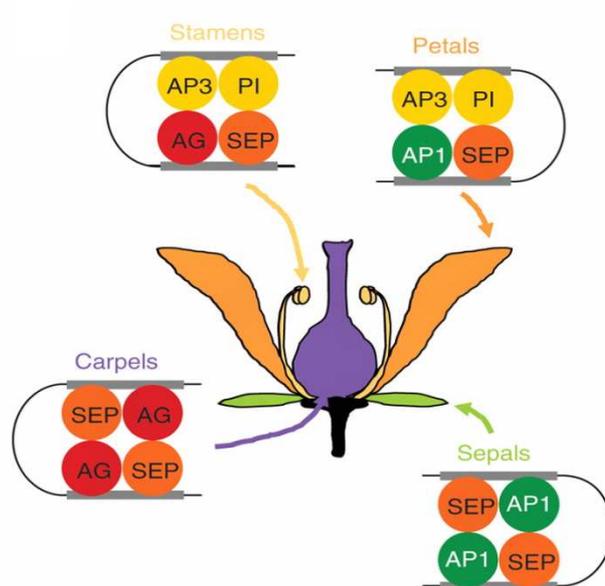


Figure 3: Le model ABC

a: Représentation schématique du modèle de développement floral ABCE, d'après les connaissances sur les espèces modèles, principalement Arabidopsis.

Les gènes des fonctions A et E sont nécessaires pour faire les sépales, les gènes des fonctions A, B et E font les pétales, les gènes des fonctions B, C et E permettent la formation des étamines et les gènes des fonctions C et E font les carpelles.

b: Représentation du modèle de quartet proposé par Theissen et collaborateurs pour *Arabidopsis thaliana* (cité dans Soltis et al., 2007). En vert, AP1 (*APETALA1*) est l'un des gènes de la fonction A; en jaune, AP3 (*APETALA3*) et PI (*PISTILLATA*) sont les gènes de la fonction B; en rouge, AG (*AGAMOUS*) est le gène de la fonction C et en orange, SEP (*SEPALLATA*) représente les gènes de la fonction E.

II.2. Contrôle génétique de l'identité florale

II.2.1. Le modèle ABC

Le modèle ABC est un modèle basé sur l'étude de mutants d'*Arabidopsis thaliana* et d'*Antirrhinum majus*, qui rend compte de l'identité et du développement des organes floraux des fleurs des eudicots et qui peut s'appliquer globalement à tous les angiospermes (Coen and Meyerowitz, 1991 ; Jack, 2004).

Selon ce modèle, l'identité des organes floraux est déterminée par l'action combinée de 3 fonctions génétiquement indépendantes. La fonction A détermine l'identité des sépales, les fonctions A+B l'identité des pétales, les fonctions B+C l'identité des étamines et la fonction C l'identité des carpelles (figure 3a) (Soltis et al., 2007). L'étude de mutants floraux a permis d'identifier trois classes de mutants (A, B et C) présentant des modifications spectaculaires de l'identité des organes de deux verticilles adjacents. Les gènes responsables de ces différentes fonctions sont des gènes qualifiés d' "homéotiques" car leur mutation provoque le remplacement d'un type d'organe par un autre.

Les mutants de classe A présentent une fleur de morphologie anormale. Les sépales ont des caractéristiques carpellaires : présence de stigmates à l'apex et présence éventuelle d'ovules sur la périphérie. Les pétales sont également anormaux et présentent des caractéristiques d'étamines : développement de filets à la base et parfois d'anthères au sommet. Cette mutation correspond donc à une transformation homéotique des sépales en carpelles et des pétales en étamines. Chez *Arabidopsis thaliana*, les gènes de la fonction A sont *APETALA1* (*API*) et *APETALA2* (*AP2*). Les mutants pour le gène *API* et les mutants pour le gène *AP2* présentent des phénotypes identiques.

Les mutants de classe B présentent des fleurs dont les pétales sont remplacés par des sépales et les étamines par des carpelles. De ce fait, le centre de la fleur est constitué de deux verticilles de carpelles mal fusionnés du fait de la gêne stérique. Le "pistil" est ainsi de grande taille et de forme irrégulière. Cette mutation correspond donc à une transformation homéotique des pétales en sépales et des étamines en carpelles. Chez *Arabidopsis thaliana*, les gènes de la fonction B sont *APETALA3* (*AP3*) et *PISTILLATA* (*PI*). Les mutants pour le gène *AP3* et les mutants pour le gène *PI* présentent des phénotypes identiques.

Les mutants de classe C présentent des fleurs produisant un nombre très important d'organes. Le premier verticille est constitué de sépales, le second de pétales. Au niveau du troisième verticille, on observe des pétales à la place des étamines et au niveau du quatrième verticille on observe des sépales à la place des carpelles. Par ailleurs, au centre de la fleur, de nouveaux

verticilles se mettent en place suivant le même modèle (sépal/pétal/pétal/sépal) comme si une nouvelle fleur se développait au cœur de la première. Le phénotype des mutants de classe C est donc double. La mutation correspond à une transformation homéotique des étamines en pétales et des carpelles en sépales. Par ailleurs, la fleur présente une croissance indéterminée. Un seul type de mutants d'*Arabidopsis thaliana* présente ce double phénotype, il s'agit des mutants pour le gène *AGAMOUS* (*AG*).

Les fonctions A et C sont antagonistes. Chez les mutants de classe A, la fonction C s'étend à l'ensemble des verticilles et *vice versa*.

Les orthologues de ces gènes ont aussi été identifiés chez *Antirrhinum majus*. La fonction A est assez peu documentée sauf chez *A. thaliana*. Chez *A. majus*, le gène homologue d'*AP1* est *SQUAMOSA* mais il ne semble pas jouer un rôle de fonction A. Les gènes homologues d'*AP2* sont *LIPLESS1* (*LIP1*) et *LIPLESS2* (*LIP2*). Les gènes de la fonction B homologues d'*AP3* et *PI* sont *DEFICIENS* (*DEF*) et *GLOBOSA* (*GLO*), respectivement. Le gène de la fonction C homologue d'*AG* est *PLENA* (*PLE*).

Tous ces gènes, sauf le gène *APETALA2* d'*Arabidopsis thaliana*, sont des gènes qui codent des facteurs de transcription de la famille des «MADS» (MADS faisant référence aux 4 gènes chez lesquels le domaine commun a été trouvé initialement : *MCMI* (*MINICHROMOSOME MAINTENANCE 1* de *Saccharomyces cerevisiae*), *AG* (*AGAMOUS*) d'*Arabidopsis thaliana*, *DEF* (*DEFICIENS*) d'*Antirrhinum majus* et *SRF* (*SERUM RESPONSE FACTOR* de l'*Homo sapiens*)). Ces facteurs de transcription sont hautement conservés et impliqués dans plusieurs aspects du développement de la plante et notamment dans la floraison et la mise en place des organes floraux (Theissen et al. 2000 ; Soltis et al., 2006 pour revue).

Le modèle ABC a été complété avec la découverte de la fonction D impliquée dans le développement de l'ovule chez le Pétunia (Colombo et al., 1995) et la fonction E qui interagit avec les fonctions A, B et C chez plusieurs espèces de core eudicots (Pelaz et al. 2000; Ditta et al. 2004) contribuant ainsi à la spécification de l'identité des sépales, pétales, étamines et carpelles. Chez *A. thaliana* c'est la famille de gènes *SEPALLATA* (*SEPI*, 2, 3 et 4) qui donne cette fonction E avec pour effet d'orienter la différenciation des primordiums pour qu'ils deviennent des primordiums floraux. L'étude de quadruples mutants *SEPI*, 2, 3 et 4 a montré la conversion de tous les verticilles floraux en structures semblables à des feuilles avec des trichomes (poils) (Malcomber et Kellogg, 2005). Les gènes de la fonction E sont nécessaires et suffisants pour induire la formation de fleurs à partir de primordiums de feuilles.

Theissen (2001) a élaboré un modèle d'interactions entre les différents gènes du modèle ABC basé sur l'étude de l'espèce modèle *A. thaliana* (Theissen, 2001, Soltis et al. 2007). Le modèle des quartets suppose que quatre combinaisons différentes de quatre protéines homéotiques florales différentes déterminent l'identité des quatre catégories d'organes floraux. Dans les triples mutants *SEP1*, 2 et 3 d'*A. thaliana*, tous les organes floraux ressemblent à des sépales, suggérant que l'action conjuguée des gènes des fonctions A, B et E est nécessaire pour former des pétales, les fonctions B + C + E sont nécessaires pour former des étamines et C + E forment les carpelles (Soltis et al. 2007). Le modèle des quartets propose que des protéines *SEP* forment des hétéro-tétramères avec les protéines des gènes des fonctions A et B pour les pétales, B et C pour des étamines et C pour les carpelles (figure 3b).

II.2.2. Les modifications du modèle ABC

Le modèle ABC classique (ou ABCE) fonctionne pour la plupart des eudicots mais certaines modifications sont nécessaires pour l'adapter aux eudicots basales et aux angiospermes basals. En effet, il semble y avoir des modèles multiples qui s'appliquent selon la position phylogénétique et la structure florale des groupes étudiés (Soltis et al., 2007). Par exemple, Van Tunen et al (1993) ont suggéré que les deux verticilles pétaloïdes de *Lilium* devaient être contrôlés par les mêmes gènes d'identité d'organe. Ils ont proposé un modèle ABC modifié dans lequel l'expression des gènes de la fonction B a été étendue jusqu'au premier verticille, convertissant ainsi ce qui aurait dû être des sépales (selon leur position) en organes pétaloïdes appelés tépales. Cette hypothèse a été appuyée par les résultats de Kanno et al (2003) qui ont montré que les gènes homologues de la fonction B s'expriment dans le premier verticille chez la tulipe (la tulipe possède, comme *Lilium*, 2 verticilles de tépales). A partir de ces observations, des modèles de « *shifting border* » ou « frontière changeante » (Bowman, 1997) et de « *sliding boundary* » ou « frontière glissante » (Kramer et al., 2003) ont été imaginés pour expliquer le « glissement » de la zone d'expression des gènes de la fonction B de son emplacement limité (d'après le modèle ABC classique) vers le verticille extérieur (comme chez les monocotylédones *Lilium* et *Tulipa* et certains eudicotylédones basales, y compris *Ranunculus* et *Aquilegia*). Chez l'ancolie, il y a encore très peu d'information concernant les fonctions A et C mais les gènes de la fonction B ont été bien étudiés, montrant un modèle ABC légèrement modifié. L'équipe d'E. Kramer (Kramer et Hodges, 2010 pour revue) a détecté 3 gènes homologues d'*AP3* (appelés *AP3-1*, *AP3-2* et *AP3-3*) et un homologue de *PI*. Chaque paralogue d'*AP3* a un modèle d'expression distinct qui évolue selon le stade de

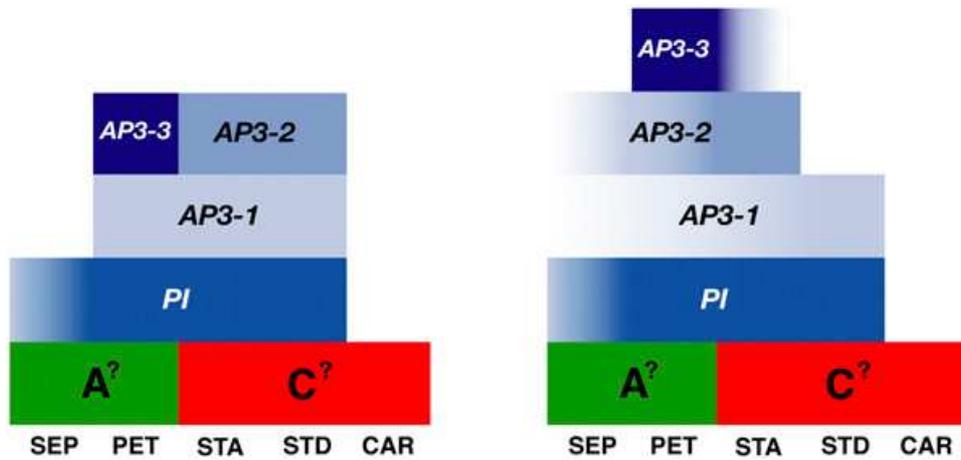


Figure 4 : Modèles ABC modifiés basés sur les expressions aux stades précoces (à gauche) et tardifs (à droite) des homologues d'*AP3* et *PI* chez *Aquilegia vulgaris* (Kramer et al., 2007). Le stade précoce correspond à la période où les sépales, les étamines et les staminodes sont initiés, tandis que le stade tardif englobe tout ce qui a lieu après l'initiation des carpelles. Des gradients colorés indiquent une expression passagère ou faible. Chez l'ancolie, il existe 3 paralogues du gène *AP3* (*AP3-1*, *AP3-2* et *AP3-3*) mais un seul homologue de *PI*. Chaque paraglogue d'*AP3* à un modèle d'expression distinct. Le domaine d'expression de *PI* regroupe tous les domaines d'expression *AP3*. Les potentielles fonctions A et C ont été notées bien que les connaissances actuelles chez l'ancolie ne permettent pas de certifier leurs zones d'action. SEP: sépales; PET: pétales; STA: étamines; STD: staminode; CAR: carpelles.

développement des organes floraux (figure 4). Le stade précoce correspond à la période où les sépales, les étamines et les staminodes sont initiés, tandis que le stade tardif englobe tout ce qui a lieu après l'initiation des carpelles. Le gène *AP3-1* est largement exprimé dans les pétales, les étamines et les staminodes (organes situés entre le verticille des étamines et celui des carpelles chez l'ancolie) à un stade très précoce du développement floral. Dès que l'initiation des carpelles a commencé, le domaine d'expression de ce gène se rétracte jusqu'à ce qu'il comprenne seulement les staminodes (Kramer et al. 2007). *AP3-2*, est exprimé légèrement plus tard dans une région couvrant les étamines et les staminodes, mais pas les pétales. Aux stades plus tardifs, son domaine d'expression se décale pour exclure les staminodes, mais s'avancer dans les pétales. *AP3-3* est très spécifiquement exprimé dans les pétales au cours de leur développement. Le gène *PI*, est largement exprimé partout dans les pétales, les étamines et les staminodes (Kramer et Hodges, 2010).

Chez quelques angiospermes basales (par exemple *Amborella*, *Illicium*), les organes floraux sont disposés en spirale avec une transition graduelle d'un type d'organe à un autre on parle alors de « *fading borders* » ou « frontières s'effaçant » (Buzgo et al., 2004). Ce modèle suggère que les transitions graduelles des organes floraux résultent d'un gradient du niveau d'expression des gènes ABC avec, dans les zones de transition d'un organe à un autre, une expression faible et chevauchante des gènes nécessaires à la mise en place de l'identité des organes. Ces interactions entre gènes permettrait la formation d'organes présentant quelques caractéristiques morphologiques de chacun des organes adjacents (Soltis et al., 2006).

II.2.3. Les gènes cadastraux

Le contrôle spatial des domaines d'expression des gènes des différentes fonctions du modèle ABC est crucial pour la mise en place des organes floraux au bon endroit sur la fleur. Les gènes responsables de la délimitation de ces domaines d'expression sont appelés « gènes cadastraux » car ils restreignent l'action d'autres gènes dans des régions spécifiques. Ces gènes sont encore assez mal connus. Le gène cadastral le mieux étudié est le gène *SUPERMAN (SUP)* d'*Arabidopsis thaliana*. Les plantes mutées pour le gène *SUP*, produisent des étamines à la place des carpelles. Cela résulte d'une expression ectopique des gènes *AP3* et *PI* de la fonction B dans le verticille 4 (Bowman et al., 1992). Au contraire, l'expression ectopique de *SUP* entraîne la suppression des pétales et des étamines (Zahn et al., 2006). Le

gène *SUP* régule donc négativement l'expression des gènes *AP3* et de *PI* dans le verticille 4 (carpelles). *SUP* agit comme « frontière » entre les verticilles 3 et 4.

Certaines limites des domaines d'expression sont déterminées par une inhibition mutuelle entre gènes. C'est le cas, par exemple, pour la frontière entre les gènes des fonctions A et C. Chez *Arabidopsis thaliana*, la répression de l'expression du gène *API* par le gène *AG* est supposée mais n'a pas encore été clairement démontrée (Zahn et al., 2006). En revanche, la répression d'*AG* dans les verticilles 1 et 2 est sous le contrôle du gène *AP2*, empêchant ainsi la conversion des pétales en organes reproducteurs. Dans les mutants simples présentant une délétion pour l'un des gènes *LEUNIG (LUG)*, *SEUSS (SEU)* ou *STERILE APETALA (SAP)*, l'expression d'*AG* a été trouvée dans les verticilles 1 et 2 (Glover, 2007). Ces gènes semblent donc interagir avec *AP2* pour limiter l'expression d'*AG* aux verticilles 3 et 4.

Il a été montré que les fleurs des plantes mutées pour le gène *RABBIT EARS (RBE)*, présentent une expression ectopique d'*AG* dans le deuxième verticille qui entraîne la production de fleurs avec des pétales fortement convertis en étamines (Zahn et al., 2006). Lorsque cette mutation est combinée avec une mutation pour *AP2* ou *LUG*, il y a une augmentation des anomalies des pétales (Krizek et al., 2006). *RBE* semble donc servir de « frontière » entre les verticilles 2 et 3 en empêchant *AG* d'être exprimé dans le deuxième verticille.

Les plantes mutées pour le gène *UNUSUAL FLORAL ORGANS (UFO)* produisent des fleurs déficientes en pétales (Durfee et al., 2003). L'ajout d'une mutation du gène *AG* dans ces mutants *UFO* a permis de rétablir la formation de pétale, indiquant que l'expression ectopique d'*AG* était responsable du manque de développement des pétales dans ces mutants *UFO* (Durfee et al., 2003). De plus, une expression d'*AG* a été détectée dans les quelques organes parfois produits dans le deuxième verticille des mutants *UFO*. Cela soutient l'idée que *UFO* semble normalement jouer un rôle de « frontière » entre les verticilles 3 et 4 pour limiter la zone d'expression d'*AG* (Krizek et al., 2006, Zahn et al., 2006).

III. La symétrie florale

Bien que les mécanismes de contrôle de l'identité des organes floraux soient aujourd'hui connus, il reste encore beaucoup de choses à étudier pour comprendre la diversité qui existe dans l'architecture des fleurs (leur taille, forme, couleur, nombre et position de chaque organe...). Parmi les étapes de mise en place de l'aspect et de l'arrangement des organes, la symétrie florale est la plus étudiée.

III.1. Types de symétries

D'une manière générale, les fleurs sont symétriques mais certaines sont asymétriques (cas rares), comme le canna.

Parmi les fleurs symétriques il y a deux formes principales de symétrie : l'actinomorphie (état ancestral) et la zygomorphie (état dérivé apparu plusieurs fois indépendamment au cours de l'évolution des angiospermes et daté d'il y a environ 60 millions d'années) (Citerne et al., 2010).

Une fleur est dite actinomorphe, ou à symétrie radiale, lorsqu'elle possède plusieurs axes de symétrie. Dans ce cas, tous les organes d'un même type (sépales, pétales ou étamines) sont de tailles et de formes identiques et sont répartis uniformément autour du réceptacle floral (figure 1a).

Une fleur est dite zygomorphe, ou à symétrie bilatérale, lorsqu'elle possède un seul axe de symétrie qui coupe la fleur en deux moitiés, images l'une de l'autre dans un miroir (figure 1b). Chez beaucoup de fleurs zygomorphes, l'unique axe de symétrie est dorsoventral et vertical, allant de la bractée (dernière feuille avant la fleur) à l'apex de l'inflorescence. Les fleurs à symétrie bilatérale ont une distribution des organes à maturité qui peut être irrégulière autour du réceptacle floral.

La symétrie bilatérale est un caractère adaptatif de la fleur qui favorise l'interaction avec des pollinisateurs spécialisés.

Les bases moléculaires de la zygomorphie sont décrites chez quelques espèces modèles, surtout chez les core eudicots. Obtenir des données dans les groupes des monocotylédones et des eudicotylédones basales est maintenant nécessaire pour préciser les mécanismes évolutifs qui sont à l'origine de la zygomorphie.

III.2. Bases génétiques de la zygomorphie

III.2.1. Les facteurs de transcription TCP

La famille de facteurs de transcription «TCP »est définie initialement à partir des gènes *Teosinte branched1 (TBI)* du maïs, *Cycloidea (CYC)* d'*A. majus* et *Proferating Cell Factor (PCF)* du riz. Vingt-quatre séquences codantes comportant un domaine TCP ont été trouvées dans le génome complet d'*Arabidopsis thaliana*. Il semble que les protéines du domaine TCP aient été recrutées au cours de l'évolution pour le contrôle de la division cellulaire et la

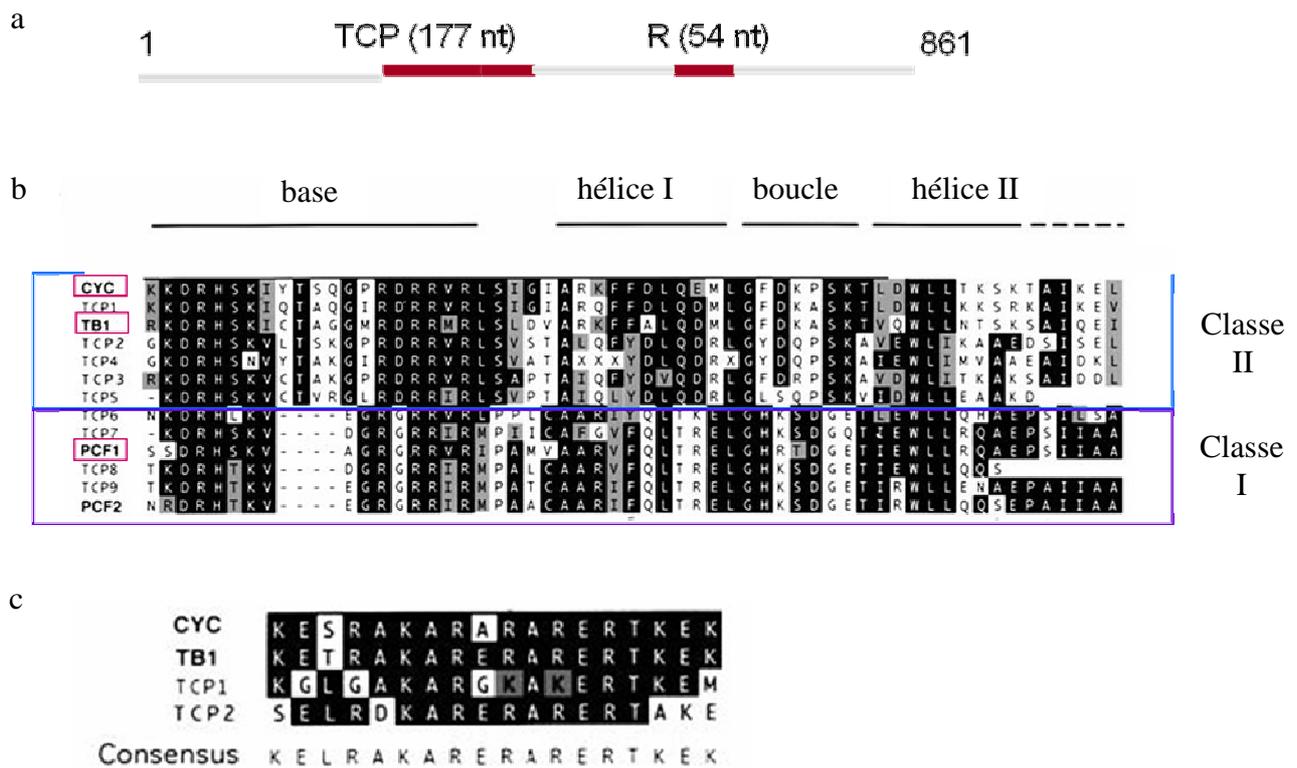


Figure 4bis : Les facteurs de transcription TCP (Cubas et al., 1999)

a: Schématisation du gène *CYCLOIDEA* d'*A. majus* composé des domaines TCP et R.
 b: Alignement des acides aminés qui constituent le domaine TCP des membres de la famille TCP. Les membres fondateurs de la famille TCP sont encadrés en rose. Les acides aminés identiques sont en noir, les acides aminés ayant une charge semblable ou un caractère hydrophobe sont en gris. La longueur variable de l'hélice II est indiquée par des pointillés.
 c: Alignement du domaine R de la sous-famille TCP de classe II.

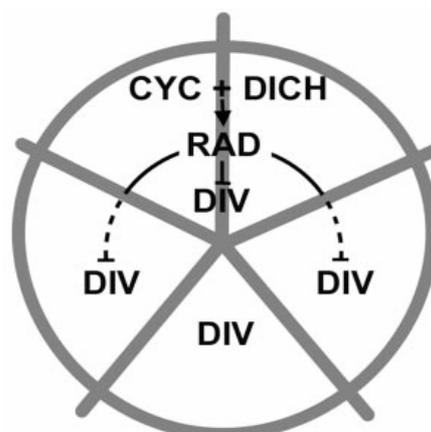


Figure 5 : Modèle d'interactions des gènes contrôlant la zygomorphie chez *A. majus*. *CYC* et *DICH* s'expriment dans le domaine dorsal (les deux sections supérieures) ce qui mène à l'activation de *RAD*, qui, à son tour, bloque l'activité de *DIV* tant dans les régions dorsales que dans une partie des régions latérales. (Corley et al., 2005).

croissance dans les différents processus de développement chez les plantes (Luo et al., 1996). Les gènes de la famille *TCP* sont caractérisés par deux domaines très conservés : le domaine TCP constitué d'un motif hélice-boucle-hélice basique original (bHLH) et le domaine R (Cubas et al 1999). Grâce à ces domaines on a pu distinguer 2 sous-familles de facteurs de transcription *TCP* : l'une apparentée à *PCF* (*TCP* de classe I) et l'autre apparentée à *CYC* et *TBI* (*TCP* de classe II). Bien qu'en grande partie conservée dans chaque sous-famille, la composition de la boucle du domaine bHLH est différente entre les deux sous-familles. De plus, les *TCP* de classe I ont une région qui leur est spécifique à la fin du domaine bHLH (la seconde hélice est rallongée) tandis que les membres de la sous-famille de classe II ont un domaine R situé à des distances variables du domaine TCP (figure 4 bis).

III.2.2. L'espèce modèle *Antirrhinum majus* : le gène clé *CYCLOIDEA*

Les bases génétiques liées au développement de la zygomorphie ont été examinées en profondeur chez *A. majus*, où de nombreux mutants d'architecture florale sont disponibles. L'analyse de mutants péloriques, chez lesquels les fleurs présentent une symétrie radiale au lieu d'une symétrie bilatérale, a permis d'identifier les gènes contrôlant cette symétrie bilatérale, et en particulier la distinction entre le côté dorsal et le côté ventral de la fleur.

Les fleurs de type sauvage d'*A. majus* ont des organes fortement différenciés selon un axe dorso-ventral, particulièrement dans les deuxième et troisième verticilles (pétales et étamines). Les pétales sont de trois types : dorsaux, latéraux et ventraux. Les deux pétales dorsaux, les deux pétales latéraux et l'unique pétale ventral ont des tailles, des formes, des types cellulaires et des symétries internes différentes. Plus précisément, les lobes des pétales dorsaux sont grands et asymétriques tandis que le lobe du pétale ventral est plus petit et bilatéralement symétrique. L'étamine dorsale est réduite à l'état de staminode (étamine stérile qui a souvent l'apparence d'une languette), tandis que les paires d'étamines latérales et ventrales diffèrent dans la longueur du filament et la villosité. Le développement inégal le long de l'axe dorso-ventral apparaît au début de l'organogenèse, avec une initiation des organes dorsaux retardée (Luo et al., 1996).

Le type de pétale et l'avortement de l'étamine dorsale sont contrôlés par l'interaction de quatre gènes appartenant à la famille des *TCP* et à la famille des gènes de facteur de transcription *MYB* (Luo et al. 1996; Corley et al. 2005). Une mutation dans le gène *CYCLOIDEA* (*CYC*, appartenant à la famille *TCP*) à un effet phénotypique fort entraînant une perte de l'identité dorsale et une ventralisation des pétales latéraux ce qui modifie la symétrie bilatérale de la

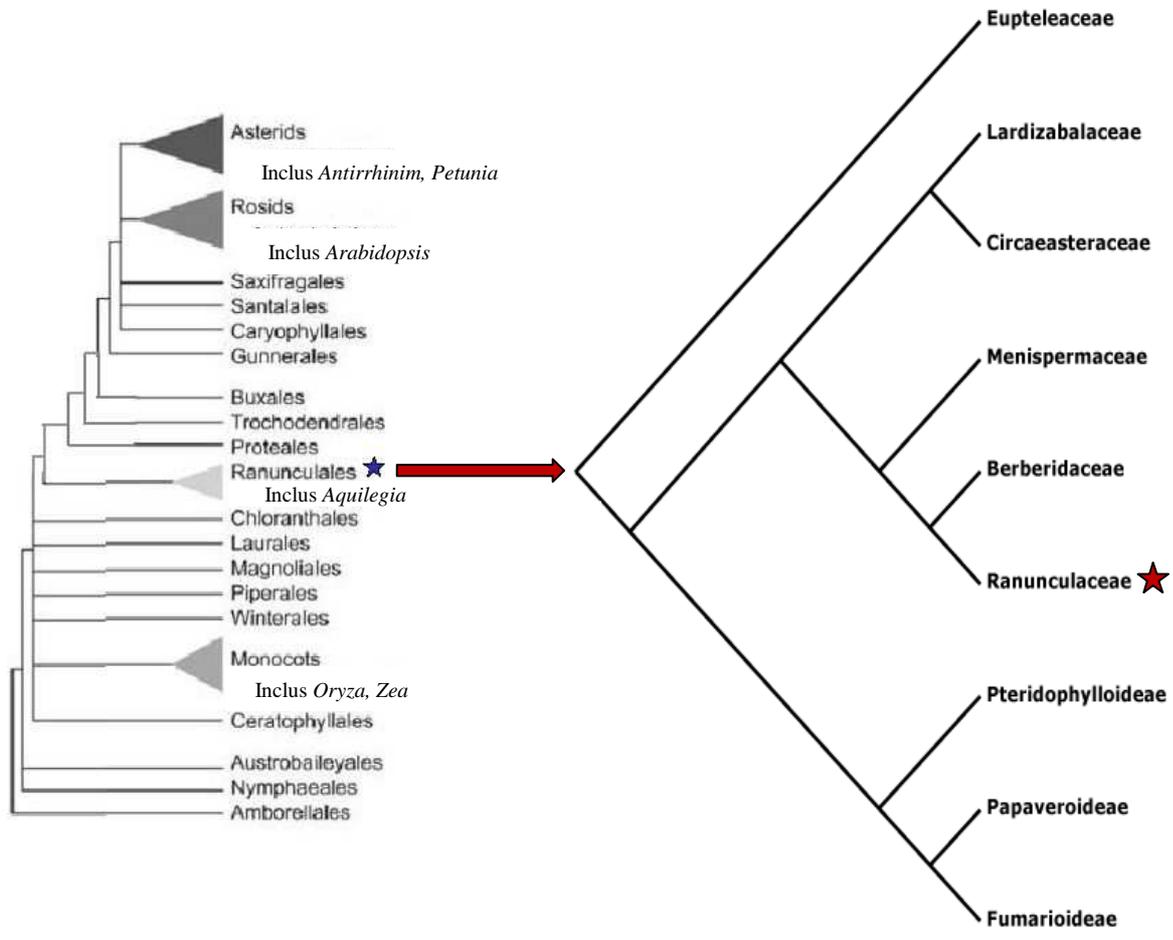


Figure 6: Arbre phylogénétique de l'ordre des *Ranunculales*.

Sur la gauche du schéma est représenté l'arbre phylogénétique des Angiospermes pour rappeler la position de l'ordre des *Ranunculales*. Sur la gauche est représenté l'arbre phylogénétique des *Ranunculales* avec les différentes familles qui le constituent.

L'étoile rouge indique la famille des Renonculacées (ou *Ranunculaceae*) qui sera détaillée dans la suite du manuscrit. (adapté de Jabbour F., 2009)

fleur en symétrie quasi-radiale (Luo et al. 1996). *CYC* et son homologue *DICHOTOMA* (*DICH*) (Luo et al. 1999) sont exprimés dans le domaine dorsal des jeunes méristèmes floraux, aboutissant à la croissance retardée des pétales et des étamines. Au cours de la croissance, l'expression de *CYC* persiste partout dans le domaine dorsal. Au stade tardif, elle y favorise la croissance des lobes des pétales et réprime le développement de l'étamine (Luo et al. 1996).

L'expression de *DICH* est limitée dans la partie dorsale de la fleur, et plus particulièrement au niveau des pétales, où il participe à la formation de leur asymétrie interne (Luo et al. 1999). L'effet au niveau dorsal des gènes *CYC* et *DICH* se fait par l'intermédiaire d'un autre gène : *RADIALIS* (*RAD*, appartenant à la famille *MYB*). En effet, il a été montré que *RAD* est activé par *CYC* dans la partie dorsale des méristèmes floraux (Costa et al. 2005). Là, il agit de manière opposée au gène *DIVARICATA* (*DIV*, appartenant à la famille *MYB*) qui est exprimé partout dans le méristème (Corley et al. 2005). *DIV* est responsable de l'identité des pétales ventraux comme l'illustrent les fleurs actinomorphes qui sont observées chez un double mutant *cyc-dich* (Galego et Almeida, 2002; Almeida et Galego, 2005). Les gènes *CYC*, *DIV* et *RAD* contrôlent la symétrie de la fleur entière mais aussi des organes eux-mêmes (Specht and Bartlett, 2009). Le modèle d'interactions des quatre gènes impliqués dans l'acquisition de la symétrie dorso-ventrale chez *A. majus* est illustré dans la figure 5.

IV. Etude de la zygomorphie chez les Renonculacées

IV.1. Pourquoi choisir les Renonculacées ?

Les bases moléculaires de la zygomorphie sont déjà décrites chez quelques espèces modèles comme *A. majus*, et toutes sont des core eudicots. On manque aujourd'hui d'informations dans les groupes plus anciens dans l'évolution comme les eudicotylédones basales ou encore les monocotylédones. Bien que les eudicotylédones basales ne représentent qu'une faible proportion des angiospermes, c'est un grade où l'on trouve une grande diversité dans la structure et la forme florale. Les fleurs d'angiospermes basales varient considérablement dans la taille, le nombre des parties florales et l'arrangement des organes floraux disposés soit en spirales soit en verticilles.

Selon l'arbre phylogénétique établi par l'APGIII, les Ranunculales sont le groupe frère de tous les autres eudicots (figure 6). Ce clade est donc crucial à une compréhension de

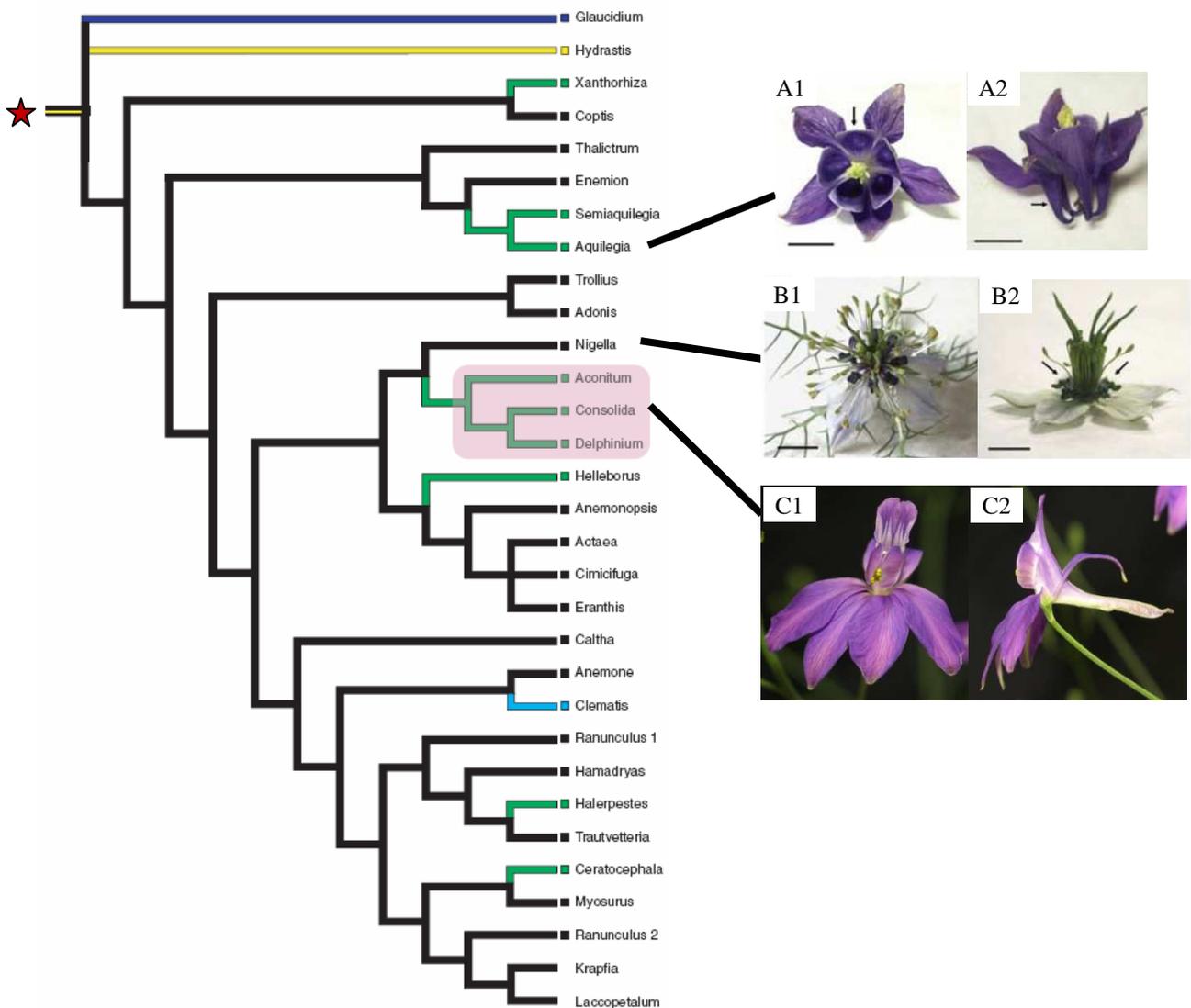


Figure 7: Arbre phylogénétique simplifié de la famille des Renonculacées.

Cet arbre montre l'évolution de la zygomorphie chez les Renonculacées avec les plantes zygomorphes encadrées en rose.

Les images A,B et C correspondent aux espèces étudiées lors de mon stage.

A1 et A2 : photographies de face et de profil d'*Aquilegia alpina* (images F. Jabbour)

B1 et B2 : photographies de face et de profil de *Nigella damascena* (images F. Jabbour)

C1 et C2 : photographies de face et de profil de *Consolida regalis* (images C. Ridel).

L'étoile rouge fait référence à l'arbre phylogénétique de la famille des *Ranunculaceae* (ou Renonculacées) qui est en figure 6. (adapté de Jabbour F., 2009)

l'évolution de la symétrie des angiospermes dans leur ensemble, étant donné sa position entre les core eudicots d'une part et les angiospermes basales et les monocotylédones de l'autre.

La zygomorphie serait apparue dans le clade des Ranunculales 3 fois indépendamment, dans 3 familles différentes (*Menispermaceae*, *Papaveraceae*, et *Ranunculaceae* (Damerval et Nadot, 2007) et avec des caractéristiques différentes (figure 6). Chez les Ménispermacées (*Menispermaceae*), on ne retrouve la zygomorphie que chez les fleurs femelles de certains genres. Chez les Papavéracées (*Papaveraceae*), l'axe de symétrie n'est pas dorso-ventral, mais transversal. Chez les Renonculacées (*Ranunculaceae*), la zygomorphie est dorso-ventrale et associée au périanthe qui est particulier à ce clade puisque les organes s'insèrent en spirale sur le réceptacle floral.

Les travaux de Kölsch et Gleissberg (2006) et de Damerval et al. (2007) sur l'étude des gènes homologues de *CYC* (*CYC*-like) chez les Papavéracées ont permis d'élargir les connaissances sur l'expression de ces gènes au sein de l'ordre des Ranunculales. Toutefois, les fleurs de ce clade sont particulières du fait de leur rotation du pédicelle pendant leur développement qui fait passer l'axe de symétrie de transversal à dorso-ventral. C'est pourquoi il a semblé intéressant d'examiner les bases moléculaires de la zygomorphie dans un autre groupe de Ranunculales, présentant une organisation florale différente.

Parmi les Ranunculales, la famille des Renonculacées est particulièrement remarquable par la grande diversité de son architecture florale, avec un périanthe comportant sépales et pétales distincts ou non, et dans ce dernier cas tous pétaloïdes ou tous sépaloïdes. La forme et les caractéristiques des pétales eux-mêmes sont diverses (plats, éperonnés, nectarifères...). Cette famille constitue un groupe clé pour comprendre les mécanismes à l'origine de la diversification des pétales et leur homologie avec ce qui est décrit chez les core eudicots (Citerne et al., 2010). De plus, la zygomorphie y est apparue une seule fois et ne concerne que 3 genres : *Aconitum*, *Delphinium* et *Consolida* (figure 7). La question est maintenant de savoir si ce sont des gènes homologues de ceux trouvés chez *A. majus* qui sont responsables de la zygomorphie chez les Renonculacées.

IV.2. Les gènes RanaCyL

Les résultats que je vais présenter maintenant sont le fruit du travail de thèse mené par Florian Jabbour à l'ESE et à l'UMR de Génétique Végétale du Moulon. Ces données n'ont pas encore été publiées (Jabbour F., 2009).

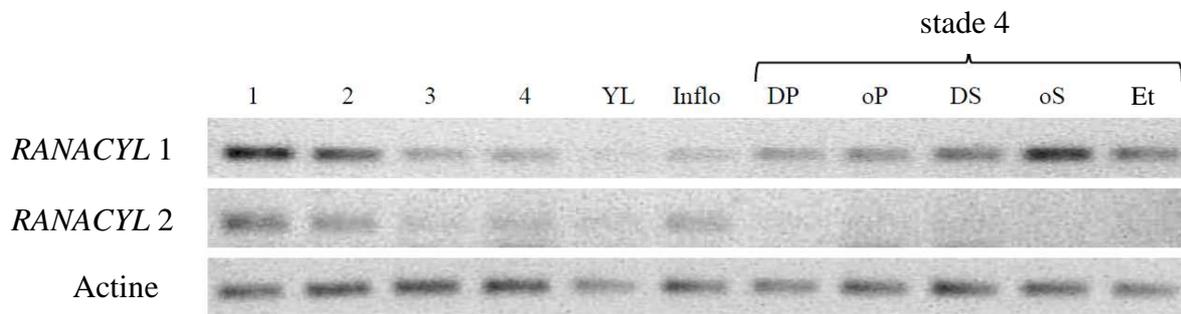


Figure 8: Résultats de PCR semi-quantitatives sur les gènes *RANACYL* d'*Aquilegia alpina*.

Les PCR ont été faites sur les ADNc de jeunes feuilles (YL pour *young leaf*), d'inflorescence (Inflo), de boutons floraux à des stades successifs de développement (1-2-3-4) et de dissections de boutons floraux juste avant floraison. DP correspond aux 2 pétales dorsaux; oP: les autres pétales (c'est-à-dire 2 pétales latéraux et 1 ventral). DS correspond au sépale dorsal; oS: les autres sépales (2 latéraux et 2 ventraux). Et: étamines. Le gène *ACTINE* sert de contrôle interne de quantité d'ADNc.

F. Jabbour a travaillé sur cinq espèces de Renonculacées, deux zygomorphes (*Aconitum napellus* et *Delphinium staphisagria*) et trois actinomorphes (*Aquilegia alpina*, *Clematis recta* et *Nigella damascena*), ayant des phénotypes floraux contrastés qui représentent bien la diversité florale de la famille. Il a caractérisé les gènes homologues de *CYCLOIDEA* (gènes *CYC*-like) chez ces 5 espèces puis il a regardé leur lieu d'expression. Les gènes homologues de *CYCLOIDEA* ont été appelé gènes *RANACYL* (RANA pour la racine de *Ranunculaceae*) et *CYL* pour *CYC*-Like car homologue de *CYCLOIDEA*).

Deux et trois copies des gènes *RANACYL* ont été trouvées, respectivement, chez les espèces actinomorphes et zygomorphes. Le fait qu'il y ait un gène *RANACYL* supplémentaire chez les espèces zygomorphes testées peut faire penser que ces gènes jouent un rôle dans le déterminisme génétique de la zygomorphie. L'expression des *RANACYL* a été étudiée à différents stades du développement des plantes et dans des organes divers pour voir si des corrélations existent entre le niveau d'expression et les changements morphologiques.

Au stade végétatif, une expression faible a été observée uniquement pour les 2 homologues des espèces actinomorphes (sauf pour *Clematis recta* où seul l'un d'eux s'exprime).

L'expression visible dans les inflorescences de toutes les espèces testées est beaucoup plus forte qu'au stade végétatif. Dans les boutons, elle va en décroissant du stade le plus précoce au stade le plus avancé du développement de l'inflorescence (figure 8). Les gènes *RANACYL* sont donc exprimés lors du développement des boutons floraux mais ces résultats ne permettent pas, pour l'instant, de statuer sur le rôle joué par ces gènes.

V. *Virus Induced Gene Silencing ou VIGS*

Afin d'éclaircir le rôle des gènes *RANACYL* dans la symétrie florale de certaines espèces de Renonculacées, nous avons cherché quelle serait la technique la plus à même de donner des résultats rapides pour un coût moindre. Nous avons choisi le *VIGS* car c'est la seule méthode qui permet une analyse fonctionnelle de gènes chez les espèces non modèles pour lesquelles aucune transformation stable n'est envisageable (Baulcombe et al., 1999 ; Purkayastha et Dasgupta, 2009). Le *VIGS* utilise la capacité naturelle des plantes à se défendre face à la pénétration d'un virus via la production de petits ARN appelés petits ARN interférants (siARN, pour « short interfering RNA »).

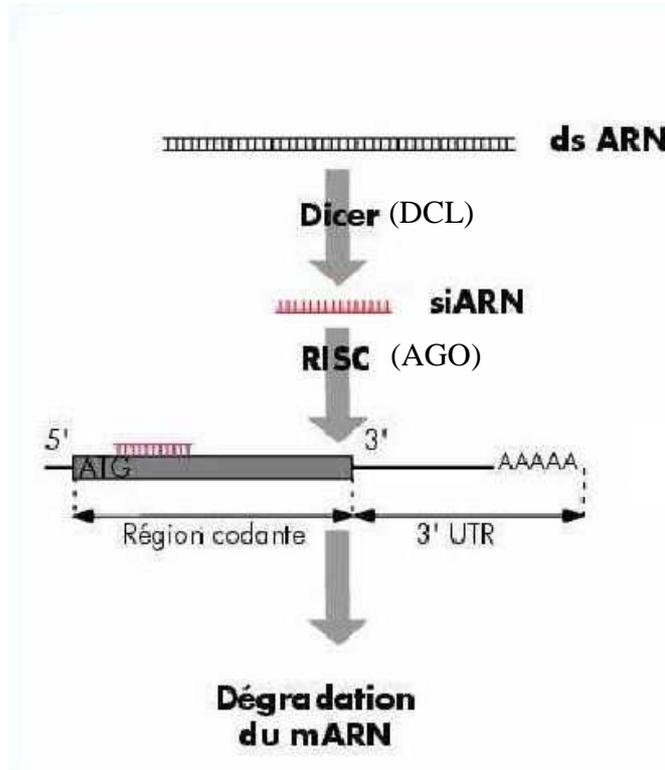


Figure 9: Mécanisme d'action des siARN.

Le siARN généré par l'action de l'enzyme Dicer se lie, par l'intermédiaire de l'enzyme Argonaute (AGO) du complexe RISC, sur une région codante d'un ARN messager. La parfaite complémentarité de séquence entre le siARN et l'ARNm provoque la dégradation de ce dernier.

V.1. Les petits ARN interférants

C'est au cours d'expériences visant à provoquer l'extinction d'un gène pour en déterminer la fonction que les siARN ont été découverts, chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Fire et Mello, 1998) : l'injection dans l'animal d'un ARN de séquence complémentaire à celle du gène d'intérêt a permis de mettre en évidence un phénomène de répression spécifique de ce gène, que les auteurs ont baptisé « interférence à ARN » (iARN) ou « RNA interference » en anglais (RNAi). Les auteurs ont découvert que c'est la présence d'un ARN double brin qui génère la répression. Il a ensuite été montré que le mécanisme peut être induit par introduction d'ARN double brin (expérimentalement ou par infection virale par exemple), ou par production d'ARN double brin par la cellule. L'analyse de ce mécanisme a révélé que celui-ci est homologie-dépendant (c'est-à-dire qu'il agit sur les ARN de séquence proche présents dans la cellule), et que l'activité répressive de l'ARN double brin nécessite son clivage en petits fragments de 21 à 24 nucléotides, appelés petits ARN interférants ou siRNA pour « short interfering RNA » (Le Douarin, 2005; Lodish et al., 2005). Le mécanisme d'action des siARN est résumé dans la figure 9.

L'interférence à ARN, également appelé « RNA silencing » chez les plantes, est aussi le mécanisme qui entre en jeu pour la défense des plantes face à l'intrusion de certains pathogènes (Voinnet, 2001 ; Waterhouse et al., 2001).

V.2. Principe du VIGS

Le VIGS utilise ce phénomène d'interférence à ARN pour induire une baisse d'expression du gène ciblé.

On utilise un virus modifié, dans lequel on a intégré la séquence du ou des gène(s) d'intérêt(s), que l'on injecte par l'intermédiaire d'*Agrobacterium tumefaciens* pour infecter la plante. Une fois dans la plante, le virus va répliquer son génome grâce à une ARN polymérase ARN dépendante (réplicase), et avec lui la séquence d'intérêt qu'il contient, conduisant à la formation d'un ARN double brin. Ces longues molécules d'ARN double brin (ARNdb) exogènes sont ensuite identifiées par la plante comme étant le signe d'une infection par un pathogène ce qui va déclencher la mise en place d'un système de défense.

La plante produit une nucléase de type Dicer (DCL pour « Dicer-like »), de la famille des RNases-III qui va couper les longs ARNdb et ainsi produire des petits fragments d'ARNdb de 21 à 24 nucléotides de long : les petits ARN interférants (ARNi).

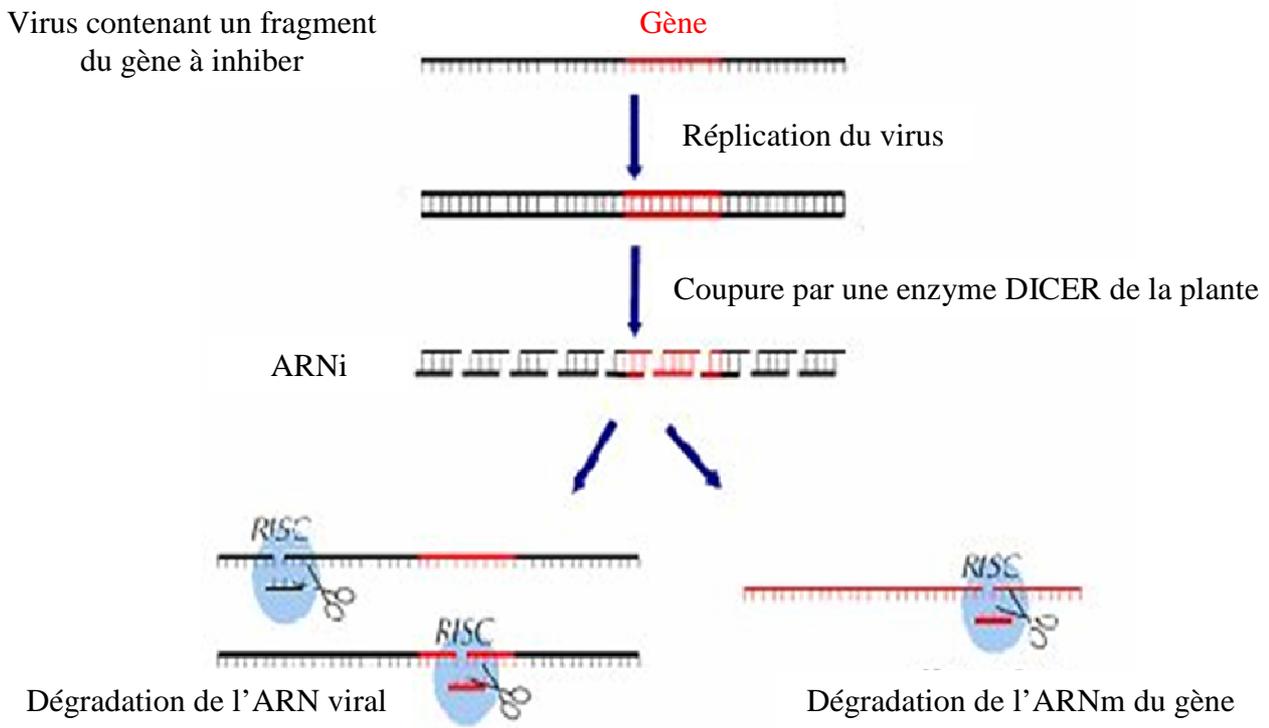


Figure 10: Principe simplifié du VIGS.

Un virus modifié avec un fragment du gène que l'on veut inhibé est injecté dans une plante. Lors de sa répliation; le virus produit des ARN doubles brins qui sont dégradés, par les enzymes DICER de la plante, en petits ARN interférents (ARNi). Ces ARNi sont incorporés dans le complexe RISC qu'ils guident vers leur ARN complémentaire. L'enzyme argonaute du complexe va dégrader l'ARN cible.

Enfin, Le brin antisens des ARNi est incorporé dans un complexe ribonucléasique contenant une protéine Argonaute (AGO) : le complexe RISC (pour « RNA-induced silencing complex »). Les ARNi guident ce complexe vers l'ARNm cible de la plante. Le brin antisens des ARNi s'apparie par complémentarité à l'ARNm cible, ce qui provoque son clivage (par AGO) au milieu de la zone d'appariement, et donc l'impossibilité de traduire une protéine fonctionnelle (Eamens et al., 2008) (figure 10). Le brin sens des ARNi est, quant à lui, pris en charge par une enzyme ARN polymérase ARN dépendante, la RDR6 (RNA-Dependent RNA polymerase 6), qui va synthétiser une copie complémentaire de cet ARN simple brin pour former un nouvel ARN double brin appelé ARNi secondaire. La RDR6 permet à la fois la diffusion de l'information aux cellules éloignées du lieu de l'infection par le virus et l'amplification du système de défense, entraînant ainsi la forte diminution de l'expression du gène d'intérêt. Selon le fragment du gène d'intérêt qu'on utilise, on peut réduire l'expression de tous les homologues de ce gène d'un coup ou être spécifique.

V.3. Virus utilisés pour induire le VIGS chez les plantes

Au cours des 15 années passées, des travaux ont été menés afin d'optimiser cette technique de VIGS afin qu'elle soit plus efficace et utilisable chez un grand nombre d'espèces de plantes. Pour que le VIGS fonctionne il faut bien choisir la combinaison virus et plante à infecter. En effet, le virus qui est utilisé comme vecteur doit avoir la capacité d'infecter l'hôte de manière systémique, c'est-à-dire dans toute la plante, jusque dans les tissus d'intérêts (tous les virus n'infectent pas les cellules méristématiques par exemple), et de s'y reproduire à un niveau suffisant pour induire une réponse.

Plusieurs types de virus ont été étudiés depuis 1995 pour être utilisés comme vecteur dans la technique du VIGS (Burch-Smith et al., 2004). Les premières expériences de VIGS ont été faites sur *Nicotiana benthamiana* en utilisant le virus de la mosaïque du tabac (TMV) ou le virus X de la pomme de terre (PVX) comme vecteurs portant un fragment d'un gène endogène qui intervient dans la synthèse des β -carotènes : le gène *Phytoene desaturase* (*PDS*) (Kumagai et al., 1995 et Ruiz et al., 1998). Les plantes infectées avec ces virus ont présenté un phénotype de blanchiment des feuilles résultant de l'inhibition du gène endogène *PDS*. Malgré tout, ces virus ne sont pas très utilisés pour l'analyse de la fonction de gène par VIGS car les plantes infectées présentent de forts symptômes de maladie virale qui peuvent rendre la visualisation et l'interprétation des phénotypes difficiles. De plus, ces virus ne pénètrent pas

dans les zones en croissance des plantes ce qui rend leur utilisation impossible pour l'étude de gènes exprimés dans ces tissus.

D'autres virus vecteurs ont été développés plus spécifiquement pour certaines plantes comme par exemple les vecteurs dérivés du virus de la mosaïque du brome (BMV) ou du virus de la mosaïque striée de l'orge (BSMV) qui permettent le VIGS chez certaines monocotylédones comme l'orge, le blé, le maïs ou le riz (Holzberg et al., 2002 ; Hein et al., 2005). Cependant, lorsqu'on utilise le vecteur BMV, la pénétration du virus et la persistance du VIGS varie beaucoup selon les tissus infectés et les gènes ciblés (Ding et al., 2006).

Plus récemment, des vecteurs issus du virus du bruissement du tabac (TRV pour *Tobacco rattle virus*) ont été développés et utilisés avec succès pour les études fonctionnelles de plusieurs gènes endogènes chez différentes espèces de plantes comme le tabac (Lu et al., 2003; Burch-Smith et al., 2004), la tomate (Liu et al., 2002), la pomme de terre (Brigneti et al., 2004), le pétunia (Chen et al., 2005), le pavot (Hileman et al., 2005), l'ancolie (Kramer et al., 2007) ou arabidopsis (Burch-Smith et al., 2006). Actuellement, il y a environ 60 espèces (de 12 familles différentes), dont monocotylédones et des eudicots basales, qui peuvent servir d'hôte au virus TRV et donc sur lesquelles il peut être utilisé comme vecteur pour une expérience de VIGS. Le virus TRV peut se répandre de manière systémique dans toute la plante, y compris dans les cellules des méristèmes et les fleurs. Les symptômes qu'il provoque sont moindres et ne masquent pas les effets ou phénotypes induit par l'inhibition du gène cible. De plus, il est utilisable sur un grand nombre d'espèces de plantes. Cela fait du TRV un vecteur très utilisé pour faire du VIGS (Zhu and Dinesh-Kumar, 2009).

V.4. Le virus du rattle du tabac (TRV)

V.4.1. Description et réplication du virus TRV

Le TRV est un virus qui a un génome bipartite avec deux brins sens d'ARN. L'ARN 1 a une longueur d'environ 6800 paires de base (pb). Il code deux protéines qui correspondent à la réplicase qui permet la reproduction du virus, une protéine de 29 kilo Dalton qui permet le mouvement du virus de cellule à cellule dans la plante hôte, une protéine de 16 kilo Dalton qui est riche en cystéine mais qui n'est pas requise pour la réplication du virus ou pour la diffusion de l'infection de cellule à cellule, et une séquence ribosomique qui permet la production de transcrits viraux. L'ARN 2 a une longueur d'environ 2100 pb. Les protéines

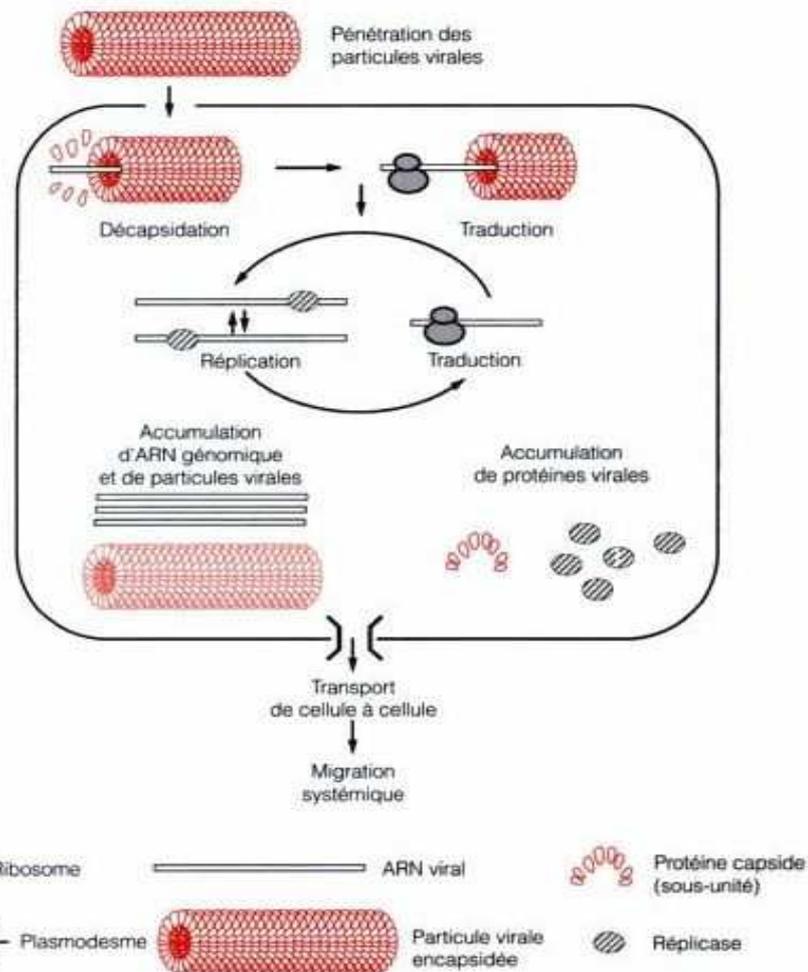


Figure 11: Principales étapes du cycle de réplication d'un virus à ARN sens simple brin. Le virus pénètre dans la cellule où il libère son ARN (décapsidation), le ribosome synthétise la réplicase qui permet de synthétiser l'ARN complémentaire qui va servir de modèle pour la synthèse de nouveaux ARN sens. Des protéines de la capsid et des protéines de mouvement sont aussi synthétisées pour former de nouveaux virus qui passeront dans les cellules environnantes par les plasmodesmes. (Albouy et Devergne, 1998).

codées par l'ARN 2 permettent la formation de la capsid, la mobilité du virus dans la plante et la transmission du virus de plantes à plantes par l'intermédiaire des nématodes.

Lors de l'infection d'une plante par le virus TRV, celui-ci détourne la machinerie cellulaire de la plante pour se multiplier. La stratégie de réplication du TRV est comparable au cas d'un virus à ARN monopartite qui aurait été découpé de manière à séparer, sur 2 pièces génomiques distinctes, les gènes codant pour la protéine de capsid et pour l'ARN polymérase virale. Un cycle de multiplication des virus à ARN monocaténaire sens, est présenté de façon simplifiée dans la figure 11. Une fois le virus entré dans la cellule, l'ARN est libéré dans le cytoplasme (décapsidation). Sa traduction permet la synthèse d'une ARN polymérase ARN dépendante ou réplisase. Le virus relarguant son ARN dans le cytoplasme et non dans le noyau, celui-ci n'a pas accès à l'ARN polymérase du noyau; il est donc nécessaire de la synthétiser à partir du matériel génétique du virus. Grâce à l'action de la réplisase, l'ARN anti-sens (-) est ensuite synthétisé; il va servir de matrice à la synthèse du brin sens (+) complémentaire. Le brin sens permet la production des protéines virales: protéines de capsid et de mouvement. Les nouvelles particules virales sont ensuite encapsidées, formant ainsi de nouveaux virus qui sont libérés par passage via les canaux qui traversent la paroi cellulaire végétale : les plasmodesmes. Les protéines de mouvement qui sont synthétisées par le virus permettent l'interaction entre le cytosquelette de la cellule et l'ARN viral entraînant ainsi le passage du complexe acide nucléique-protéine au travers des plasmodesmes. Les virus peuvent aussi se déplacer à grande distance dans la plante s'ils atteignent le tissu conducteur de la sève : le phloème. Ils sont ensuite relargués dans les autres tissus de la plante où ils vont à nouveau se répliquer (Scholthof, 2005).

V.4.2. Le TRV utilisé comme vecteur pour le VIGS

Les ARN du virus TRV ont été modifiés pour créer deux vecteurs utilisables pour réaliser la technique du VIGS. Sur chacun des vecteurs un promoteur 35S dupliqué du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) et un terminateur du gène de la *nopaline synthétase* (*nopaline synthase terminator* : NOS) ont été intégrés. Entre ces deux éléments, un ADNc codant soit l'ARN1 soit l'ARN2 du TRV à été inséré, permettant ainsi de générer des transcrits viraux intacts. Ces vecteurs sont notés respectivement TRV1 et TRV2 (figure 12). Les gènes nécessaires à l'infection de la plante par les nématodes ont été délété de TRV2

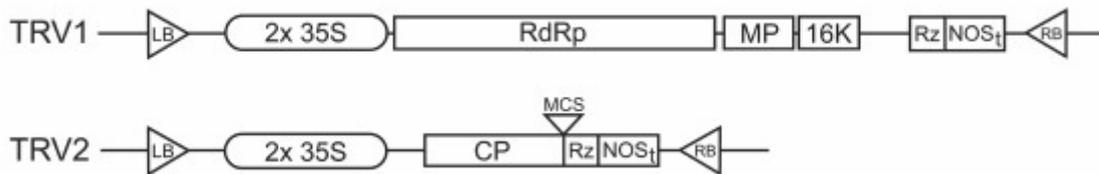


Figure 12: Vecteur bipartite (TRV1 et TRV2) issus du virus TRV pour la technique du VIGS.

Les cDNA issus des ARN1 et 2 du virus TRV ont été placés entre un promoteur 35S dupliqué du *Cauliflower mosaic virus* (noté 2x 35 S sur le schéma) et un terminateur du gène de la *nopaline synthétase* (*nopaline synthase terminator* : NOS_t).

LB and RB sont bordures gauche et droite de chaque construction.

RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) est la répliqueuse; MP, protéine de mouvement; 16K est une protéine de 16kDa riche en cystéine; Rz correspond à la séquence ribosomique qui permet la production de transcrits viraux ; CP est une protéine de formation de la capside et MCS est le site de clonage multiple.

(Ratcliff et al., 2001) et, à la place, un site de clonage multiple à été intégré permettant d'insérer facilement et rapidement le ou les gène(s) à inhiber (Burch-Smith et al., 2004 ; Dinesh-Kumar et al., 2003). Un site d'auto-appariement du ribosome à également été ajouté à l'ARN1 pour une production plus efficace de l'ARN viral. Les séquences d'intérêts qui sont insérées dans le vecteur viral peuvent théoriquement n'avoir que 23 nucléotides (taille des siRNA) mais en pratique la taille idéale se situe entre 300 et 1500 pb (Liu et Page, 2008).

Pour une meilleure efficacité du VIGS, TRV1 et TRV2 sont inclus séparément dans *Agrobacterium tumefaciens* puis les cultures bactériennes sont mélangées et enfin infiltrées dans la plante étudiée. L'ARN viral injecté dans la plante via les agrobactéries sert de matrice pour la synthèse de nouveaux ARN viraux grâce à la réplicase codée par l'ARN1. Il s'ensuit une généralisation de l'infection par le virus TRV qui va déclencher la mise en place de la défense de la plante et donc l'inhibition du ou des gène(s) cible(s).

V.5. Avantages et inconvénients du VIGS

Le VIGS a beaucoup d'avantages mais aussi quelques inconvénients comparés à d'autres techniques utilisées pour l'analyse fonctionnelle de gènes de plante (Burch-Smith et al., 2006). Tout d'abord c'est une méthode relativement facile à mettre en œuvre et qui permet de visualiser rapidement un phénotype spécifiquement dû à l'inhibition d'un gène choisi, pour un coût relativement bas. De plus, c'est une méthode dont les effets sont transitoires dans la majorité des cas. Sa vitesse de visualisation ainsi que sa durée sont variables selon les espèces. Par exemples, les effets du VIGS avec le vecteur BSMV chez l'orge sont visibles au bout de 1 à 2 semaines tandis que l'effet du VIGS avec le TRV chez le pavot de Californie n'est visible qu'au bout de 16 semaines (Wege et al., 2007 ; Holzberg et al., 2002). L'un des rares cas de transmission du VIGS à la descendance a été observé chez le soja avec le vecteur issu du virus sphérique latent de la pomme (ASLV) où l'effet du VIGS a persisté toute la vie de la plante et s'est transmis à la génération suivante (Becker et Lange, 2010).

Contrairement à l'utilisation des collections de mutants, il n'est pas nécessaire de tester un grand nombre de plantes, il peut suffire d'une seule plante présentant un phénotype pour avoir un résultat probant, qui sera facilement reproductible (Benedito et al., 2004).

La transformation de plantes est l'un des procédés qui peut être utilisé pour l'analyse fonctionnelle de gènes mais cette technique est difficile à mettre au point chez beaucoup d'espèces et il s'avère parfois impossible d'avoir des plantes viables notamment lorsque le gène testé joue un rôle crucial dans le développement de la plante. Le VIGS ne nécessite pas

la production de plantes transgéniques, c'est donc une technique particulièrement utile sur les plantes pour lesquelles la transformation est impossible ou difficile. On peut la réaliser sur des plantules comme sur des plantes adultes et, selon le vecteur utilisé, il n'y a pas (ou très peu) de mort des plantes même si le gène inhibé entre en jeu à un stade précoce du développement. L'étude d'un gène issu d'une famille multigénique peut parfois s'avérer compliquée. Avec le VIGS il est possible d'inhiber en même temps tous les membres d'une famille ou au contraire un seul membre spécifiquement. Pour cela, il suffit de choisir soit une région conservée chez tous les membres de la famille de gènes ciblée ou au contraire une zone spécifique de l'un d'entre eux.

Un autre avantage du VIGS est qu'il permet aisément la comparaison de la fonction d'un gène entre différentes espèces grâce, par exemple, à l'utilisation du vecteur TRV qui peut être utilisé sur *N. benthamiana*, la tomate ou *Aquilegia alpina* (Ekengren et al., 2003 ; Liu et al., 2002; Gould and Kramer, 2007).

En dépit de ses nombreux avantages, la technique du VIGS présente aussi quelques inconvénients. Le plus important d'entre eux est que l'inhibition du gène ciblé n'est pas complète. Généralement on obtient 75 à 90% de baisse du niveau d'expression ce qui peut être suffisant pour produire une protéine fonctionnelle et donc empêcher la visualisation de l'effet dû à l'inhibition (Unver et Budak, 2009).

Le choix du virus utilisé comme vecteur est un élément fondamental. En effet, tous les virus ne peuvent pas pénétrer dans tous les tissus des plantes, il faut donc veiller à bien le choisir sous peine de ne pas voir l'effet de l'inhibition du gène d'intérêt. De plus, certains virus utilisés comme vecteur pour le VIGS provoquent des symptômes qui peuvent masquer un phénotype subtil à cause, par exemple, d'une modification du développement ou de la morphologie de la plante. Certains phénotypes peuvent également être cachés par de la redondance fonctionnelle des autres membres de la famille du gène ciblé.

V.6. Chez quelles espèces d'eudicotylédones basales le VIGS a été utilisé?

Parmi les espèces pour lesquelles la technique du VIGS a été mise au point il y a très peu d'eudicotylédones basales. Seules 4 espèces ont été étudiées par cette méthode : le pavot à opium (*Papaver somniferum*) (Drea et al., 2007), le pavot de californie (*Eschscholzia californica*) (Wege et al, 2007), le pigamon en massue (*Thalictrum clavatum*)(Di Stilio et al., 2010) et l'ancolie commune (*Aquilegia vulgaris*) (Gould et kramer, 2007).

VI. *Objectifs de mon stage*

Chez *Antirrhinum majus*, il a été démontré que le gène *CYC* (de la famille des *TCP*) contrôle l'asymétrie dorso-ventrale de la fleur.

Nous avons utilisé une approche de type « gène candidat » pour tenter de déterminer le rôle précis de gènes supposés actifs dans la mise en place de la symétrie florale chez certaines Renonculacées. Nous avons donc utilisé les homologues de ce gène *CYC* comme gènes candidats. F. Jabbour, lors de sa thèse, a caractérisé des gènes homologues chez 5 espèces de Renonculacées : les gènes *RANACYL* (données non publiées). Il a montré que les gènes *RANACYL* s'expriment à un stade précoce du développement et ce aussi bien pour des fleurs zygomorphes qu'actinomorphes.

Chez les Renonculacées, aucun lien n'a été établi, à l'heure actuelle, entre un type de symétrie donné et un ou des gènes particulier(s), bien que des gènes « *CYC like* » aient été caractérisés et leurs sites d'expressions localisés (Damerval et al., 2007 ; Jabbour F., 2009). Afin de tenter de connaître le rôle réel des gènes *RANACYL* chez les Renonculacées sur la morphologie florale, nous avons choisi d'utiliser la technique du VIGS qui est actuellement la méthode la plus rapide, fiable, facile et peu coûteuse pour l'analyse fonctionnelle de gène pour les espèces difficiles/impossibles à transformer.

L'Ancolie fait parti des plantes testées par F. Jabbour et bien qu'elle soit actinomorphe et qu'elle ne soit donc pas la plante idéale pour notre étude de la fonction des gènes *RANACYL* dans la zygomorphie, nous l'avons choisi comme plante modèle car c'est la seule Renonculacée pour laquelle la technique du VIGS est opérationnelle (Gould et Kramer, 2007). Dans la suite du manuscrit les deux gènes *RANACYL* de l'ancolie seront appelés *TCP1* et *TCP2*.

Pour préparer de futures analyses complémentaires à celle-ci, j'ai réalisé deux autres expériences. L'une va permettre d'étendre nos connaissances sur le rôle des gènes *TCP* au sein de la famille des Renonculacées grâce au test de la technique du VIGS sur d'autres Renonculacées actinomorphes et zygomorphes (*Nigella damascena* et *Consolida regalis*). L'autre devrait nous permettre de connaître l'impact du degré d'identité entre séquences hétérologues sur l'effet du VIGS chez *Aquilegia alpina*.

Matériel et Méthodes :

I. *Matériel végétal et conditions de culture*

Quatre espèces de Renonculacées ont été étudiées : *Aquilegia coerulea*, *Aquilegia alpina*, *Nigella damascena* et *Consolida regalis*.

J'ai acheté les graines d'*Aquilegia coerulea* variété 'Origami', rouges et blanches, (notées 'Origami') chez Swallowtail Garden Seeds (Santa rosa, CA, USA).

Les graines d'*Aquilegia alpina* (*A. alpina*), de *Nigella damascena* (*N. damascena*) et de *Consolida regalis* (*C. regalis*) ont été collectées par F. Jabbour dans le cadre de sa thèse et proviennent d'horticulteurs ou du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris (numéro d'accession de *N. damascena* au muséum : 04-98).

Les 'Origami' ont été choisis parmi les nombreuses espèces et variétés d'Ancolie sur les conseils d'E. Kramer à cause de leur rapidité de croissance et de la couleur rouge de leurs fleurs qui va permettre de bien voir l'effet de l'inhibition du gène *ANTHOCYANIDINE SYNTHASE* (les fleurs deviennent blanches).

I.1. Culture des 'Origami'

Deux séries de 100 graines ont été semées à 15 jours d'intervalle en serre à 18°C le jour et 16°C la nuit (conditions décrites en annexe 2).

Une fois au stade 3-4 feuilles, les plantes ont été repiquées puis transférées dans la chambre de vernalisation où elles sont restées 3 semaines afin d'induire leur floraison. Après la vernalisation à 10°C le jour et 5°C la nuit (conditions décrites en annexe 2), les plantes ont été placées en serre dans un compartiment de niveau 3 de confinement à 18°C le jour et 16°C la nuit (annexe 2).

La première série de plantes a eu plus de mal à germer et a poussé moins vite que la seconde pendant la vernalisation, ce qui fait qu'au moment de leur transfert en serre toutes les plantes étaient de la même taille.

I.2. Culture des *A alpina*, *N. damascena* et de *C. regalis*

Trois plateaux de 24 pots contenant chacun 2 graines ont été semés dans le compartiment de confinement de niveau 3 pour les ancolies et les nigelles (soit environ 150 graines par espèce).

Les nigelles ont été semées 10 jours après les ancolies pour tenir compte de la vitesse de germination des plantes et ainsi les avoir toutes au même stade de développement pour les infiltrer le même jour.

Lorsque les plantules ont atteint le stade 3-4 feuilles (soit 43 jours après le semis pour les ancolies ou 33 jours pour les nigelles), elles ont été infiltrées sous vide puis repiquées en barquettes de 6 plantes.

Les graines de consolida ont été plus difficiles à obtenir aussi seulement 50 graines ont été semées. Seules 3 de ces graines ont germé c'est pourquoi la technique de VIGS n'a pas pu être testée sur cette espèce.

II. *Souches bactériennes*

II.1. Souche d'*Escherichia coli*

La souche DH5 α électro-compétente d'*Escherichia coli* a été utilisée pour les différents clonages. Ces bactéries sont cultivées à 37°C en milieu LB (milieu Luria-Bertani) liquide ou solide avec soit de l'ampicilline (lorsque le vecteur est pGEMT), soit de la kanamycine (lorsque le vecteur est TRV2) pour sélectionner les clones d'intérêt.

II.2. Souche d'*Agrobacterium tumefaciens*

Pour les expériences de VIGS, la souche d'agrobactérie *Agrobacterium tumefaciens* C58 a été utilisée. Ces bactéries sont cultivées à 28°C en milieu LB liquide ou solide contenant de la rifampicine, de la gentamicine et de la kanamycine pour sélectionner les bactéries ayant intégré un plasmide TRV (porteur de la résistance à la kanamycine). En effet, sur l'un des deux chromosomes de cette souche d'agrobactérie se trouve un gène de résistance à la rifampicine. Elle possède aussi un plasmide helper qui lui confère une résistance à la gentamicine.

Des agrobactéries contenant soit le plasmide TRV1 soit le plasmide TRV2 étaient déjà disponibles au laboratoire. Ces plasmides sont issus du virus de tabac (TRV : Tobacco rattle virus (virus du bruissement du tabac)). La souche contenant le plasmide TRV2 a été utilisée pour y intégrer les différentes constructions nécessaires pour mes expérimentations.

Tableau I: Liste des amorces et leur utilisation

nom amorce	séquence 5'-3'	taille attendue (pb)	utilisation
ANS-F-Xba1	GG TCTAGA TTGGGATTGGAAGAAGAAAGGC	440	obtention du fragment du gène ANS d' <i>Aq. vulgaris</i> inclus dans le plasmide TRV2 par Kramer E.
ANS-R-BamH1	AAG GATCC ATGTTGAGCAAATGTGCGA		
Ao-TCP1-BamH1F	GGATCC AATTCCTCCGGGATTCCTCA	variable (de 177 à 298)	obtention d'un fragment du gène TCP1 à inclure dans le plasmide TRV2
Ao-TCP1-sac1R	GAGCTC TGATCTTCTTCGAGGGTTTTTC		
Ao-TCP1-BamH1F2	GGATCC CCCCAAATCAATAGAGAAACCA		
Ao-TCP1-sac1R2	GAGCTC GGGCAATATCGAGTGAGAGC		
Ao-TCP1-BamH1F3	GGATCC AGAAACTCATCCCCAAATCAA		
Ao-TCP1-sac1R3	GAGCTC TGGGCGGTGACAATTTTAGT		
Ao-TCP2-sac1F	GAGCTC AAGGGTTGTGCAATTCGAAG	variable (de 154 à 332)	obtention d'un fragment du gène TCP2 à inclure dans le plasmide TRV2
Ao-TCP2-xho1R	CTCGAG CTTCCACTCATGCCATTAACC		
Ao-TCP2-sac1F2	GAGCTC TTCCAAGCCACAATGTGTCA		
Ao-TCP2-xho1R2	CTCGAG CCTTCTTGAAAGACCCAGCA		
Ao-TCP2-sac1F3	GAGCTC CATGAGGACCGCTTTTACCAG		
Ao-TCP2-xho1R3	CTCGAG GTCCTAGTGCCTTGAGCAG		
PDS_F	TGGAARGARCAAYTCIATGATWTTTGCWATG	600	obtention du gène PDS chez <i>N. damascena</i> et <i>C. regalis</i>
PDS_R	ACRACATGRTACTTIVADATYTTWGCTTT		
PDS-F2-Xba1	GG TCTAGA CAGCCGATTGATTCCAGAT	440	obtention d'un fragment du gène PDS chez <i>Aq. vulgaris</i> à inclure dans le plasmide TRV2
PDS-R3-BamH1	AAG GATCC GAGAATTGAGTCGGACTTCACC		
PDS-Nd-F2-Xba1	GG TCTAGA CAGTCGATTGATTTCTAGAT	440	obtention d'un fragment du gène PDS chez <i>N. damascena</i> à inclure dans le plasmide TRV2
PDS-Nd-R3-BamH1	AAG GATCC GAGAATTGAGTCGAACCTGACC		
PDS-Cr-F2-Xba1	GG TCTAGA CAGTCGGTTGATTCCAGAA	440	obtention d'un fragment du gène PDS chez <i>C. regalis</i> à inclure dans le plasmide TRV2
PDS-Cr-R3-BamH1	AAG GATCC GAGAATTGAGTTAACTTGACC		
M13-21	TGTA AACGACGGCCAGT	variable (environ 450)	vérification des inserts dans le plasmide pGEMt
M13rev	CAGGAAACAGCTATGACC		
TRV2-1	GGTCAAGGTACGTAGTAGAG	variable (environ 350)	vérification des inserts dans le plasmide TRV2
TRV2-2	CGAGAATGTCAATCTCGTAGG		
TRV2_F1	GAAATTCAGAGGGTGGGTGA	variable (environ 400)	vérification des inserts dans le plasmide TRV2
TRV2_R1	CCCTTTTGCCTTTGTAACCA		
Aq Actine-2	GTATTGTGTGGACTCTGGTGATGGTGT	580	vérification expression du gène Actine
Aq Actine-1	GATGGATCCTCCAATCCAGACACTGTA		
AqvANS-F	AGTTCATTCCAAGGAGTATGTGC	738	vérification expression du gène ANS
AqvANS-R	TGGCAGTCAACCATTTTTCATC		
FoAa1	ACAAGGTCTAGAGATCGT	358	vérification expression du gène TCP1
ReAa1	AAGGGGATTGAATGTAGCT		
FoAa2	GCACTAGGGACAGGAGAAT	325	vérification expression du gène TCP2
ReAa2	GTGTGCTTTTCTCTCTCA		
AqvAP3-1 F	GGTTGGTGCTGAAGATCTAAG	340	vérification expression du gène APETALA3-1 (AP3-1)
AqvAP3-1 R	TCCGTCACCATGAAGATTTGGC		
AqvAP3-2 F	TGAGAGAATGCAAGATACCTTCG	330	vérification expression du gène APETALA3-2 (AP3-2)
AqvAP3-2 R	CTTCAAAGTCAAGTGCTGGAAAGC		
AqvAP3-3	TGAGTCTGTGAAACTTGTTCGGG	520	vérification expression du gène APETALA3-3 (AP3-3)
AqvAP3-3 R	GCAATGCGAATAGCAATGCC		
AqvPI F	AGAAGCTGTGGGATGCAAAGC	326	vérification expression du gène PISTILLATA (PI)
AqvPI R	TGAACACGGAAGGTGAATGGC		
PDS-F2A	CAGCCGATTGATTTCCAGATGTTCTCCAGCAC	580	vérification expression du gène PDS chez <i>Aq. alpina</i>
PDS-R2A	AATCTCTTCCACTCCTCGGGCAG		
PDS-F3A	GCGGTTTGCAATTTGACTAT	480	vérification expression du gène PDS chez <i>Aq. Alpina</i>
PDS-R3A	CCACTACATTTCCCGTTGCTT		
PDS-F2N	CAGTCGATTGATTTCTAGATGTTCTTCCGAC	580	vérification expression du gène PDS chez <i>N. damascena</i>
PDS-R2N	GATGTCTTCCACTCCTCGGGCAG		
PDS-F3N	GCGGTTTGCTATTGACTAT	580	vérification expression du gène PDS chez <i>N. damascena</i>
PDS-R3N	CTATAACATCACCGTTGCTT		

Des agrobactéries contenant le plasmide TRV2 porteur d'un fragment du gène *ANTHOCYANIDINE SYNTHASE* (*ANS*) ou *PHYTOENE DESATURASE* (*PDS*) d'*A. vulgaris* ont été fournies par E. Kramer (Gould et Kramer, 2007).

III. Caractérisation des gènes d'intérêt et clonage

III.1. Extraction d'ADN et d'ARN des plantes

Les ARN totaux d' 'Origami', d'*A. alpina*, de *N. damascena* et de *C. regalis* ont été extraits à partir de 100mg de feuilles (en poudre et congelées) avec le kit *RNeasy Plant Mini Kit* en suivant les instructions du fabricant (Qiagen).

Ces ARN ont ensuite été traités à la DNase (Invitrogen) pour éliminer l'ADN génomique qui aurait pu être extrait en même temps que les ARN. Une transcription inverse (*Reverse Transcription*, RT) a ensuite été réalisée avec la Superscript II selon les instructions du fabricant (Invitrogen) avec des oligos dT pour permettre la synthèse des ADN complémentaires (ADNc) des ARN messagers extraits des plantes.

III.2. Amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) des différents gènes

III.2.1. Gène de l'ANS (*ANTHOCYANIDINE SYNTHASE*)

Le gène *ANTHOCYANIDINE SYNTHASE* (*ANS*) a été obtenu par Gould et Kramer (2007) à partir de la base de données d'EST d'ancolie [DR946275 and DR946276], ils ont dessiné des amorces (ANS-F-XbaI et ANS-R-BamHI dans le tableau I) pour amplifier un fragment de 440 pb (paires de bases) sur *Aquilegia vulgaris* (*A. vulgaris*).

Le gène *ANS* est un gène constitutif très conservé d'une espèce à une autre, nous avons donc utilisé le gène obtenu chez *A. vulgaris* comme s'il avait été obtenu chez 'Origami '.

III.2.2. Gènes *TCP1* et *TCP2*

Au cours de sa thèse, F. Jabbour a identifié 2 gènes homologues de *CYCLOIDEA* (appelés gènes *TCP1* et *TCP2* dans ce rapport) chez *Aquilegia alpina*.

J'ai dessiné plusieurs couples d'amorces directement à partir de ces séquences, dans une zone non conservée des gènes *TCP* afin d'obtenir une amplification spécifique de chacun des homologues. Ces amorces permettent d'amplifier des fragments de 154 à 332 pb à partir

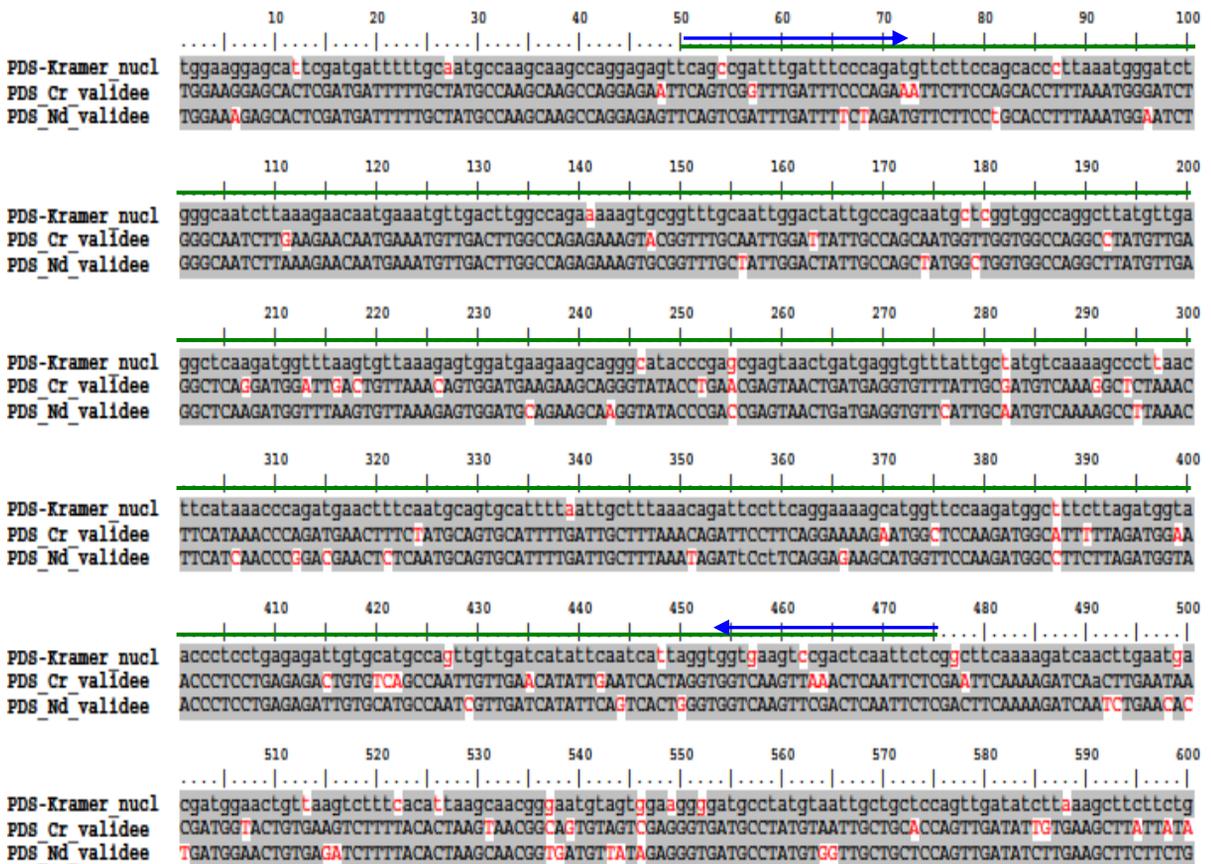


Figure 13 : Comparaison des séquences du gène *PDS* d'*A. alpina*, de *N. damascena* et de *C. regalis* :

La séquence obtenue par E. Kramer sur *A. alpina* est notée « PDS-Kramer_nucl ». Les séquences obtenues par PCR sur *N. damascena* et *C. regalis* sont notées « PDS-Nd_validée » et « PDS-Cr_validée ». Les différences entre les séquences sont visualisées par des lettres rouges sur fond blanc. Les fragments infiltrés dans les plantes sont indiqués par un trait vert. Les amorces utilisées pour amplifier ces fragments sont localisées par une flèche bleue.

d'ADNc et ont des extrémités contenant des sites de restrictions (tableau I) qui serviront, par la suite, à l'insertion de ces fragments dans le plasmide TRV2. Toutes les combinaisons d'amorces F/R ont été testées et tous les produits PCR obtenus ont été utilisés pour être clonés dans le vecteur pGEMT.

III.2.3. Gènes *PDS* d'*A. alpina*, de *N. damascena* et de *C. regalis*

Le gène *PHYTOENE DESATURASE (PDS)* d'*A. vulgaris* a été obtenu par Gould et Kramer (2007) par PCR sur ADNc en utilisant des amorces dégénérées dans une région conservée du gène (PDS_F et PDS_R du tableau I). Ce fragment de PDS a ensuite été séquencé et son identité confirmée par blast sur le site NCBI [DQ923721]. Puis des amorces de ré-amplification avec des extrémités contenant des sites de restrictions ont été dessinées (PDS-F2-XbaI et PDS-R3-BamH1 sur le tableau I) pour amplifier un fragment de 440 pb. Le gène *PDS* est un gène constitutif conservé d'une espèce à une autre, nous pouvons donc utiliser le gène obtenu chez *A. vulgaris* comme s'il avait été obtenu chez d'*A. alpina*.

J'ai utilisé la même démarche pour amplifier le gène *PDS* de *N. damascena* et *C. regalis* avec les amorces dégénérées PDS_F et PDS_R (figure 13), puis j'ai dessiné des amorces de ré-amplification, avec des extrémités contenant des sites de restrictions, spécifiques de chaque espèce (tableau I).

III.3. Clonage dans pGEMT et transformation d'*E.coli*

Les produits PCR obtenus ont été ligués séparément dans des plasmides pGEMT avec la T4 DNA ligase selon les indications du fournisseur (kit de ligation A1360 de Promega).

J'ai ensuite transformé des *E.coli* DH5 α électro-compétentes avec les plasmides obtenus et je les ai mises à pousser sur du milieu LB solide contenant de l'ampicilline pour sélectionner les bactéries résistantes, de l'IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) pour induire l'enzyme β -galactosidase et de l'X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) qui va être hydrolysé par l'enzyme en formant un composé bleu. Les bactéries ayant incorporées le plasmide n'auront pas de production d'enzyme et formeront des colonies blanches (protocole détaillé en annexe 3).

III.4. Séquençage et validation des clones

Les colonies obtenues ont ensuite été triées par PCR en utilisant les amorces M13-21 et M13rev (tableau I) qui entourent le site de clonage du plasmide pGEM-T. Les ADN plasmidiques des clones sélectionnés ont été extraits selon le protocole de lyse alcaline mis en place en routine au laboratoire (annexe 4) puis les clones ont été séquencés avec les amorces M13-21 et M13rev. Le logiciel Bioedit a permis d'aligner les séquences obtenues avec les séquences de référence pour valider les clones bactériens. A l'issue de cette étape j'ai sélectionné et stocké au congélateur -80°C (stock glycérol) un clone pour chaque construction : TCP1-clone10, TCP2-clone45, PDS-Nd76 et PDS-Cr90.

III.5. Intégration des constructions dans les plasmides TRV2 ou TRV2-ANS et transformation d'*E. coli*

L'ADN plasmidique des 4 clones sélectionnés a subi une double digestion avec les enzymes de restrictions *Bam*HI et *Xba*I pour les clones avec le fragment de *PDS*, *Bam* HI et *Sac*I pour le clone avec le fragment de *TCP1* et *Sac*I et *Xho*I pour le clone avec le fragment de *TCP2*.

Le vecteur TRV2 a été digéré avec les enzymes *Bam*HI et *Xba*I et le vecteur TRV2-ANS (fournit par E. Kramer) avec *Bam*HI et *Sac*I, ou *Sac*I et *Xho*I. Les enzymes de restrictions ont été choisies, en fonction des sites existants sur le vecteur TRV2, pour qu'elles ne coupent pas les fragments de nos gènes d'intérêts.

Les produits de digestion ont ensuite été mis à migrer sur gel d'agarose, les bandes d'intérêts ont été découpées et l'ADN purifié avec le kit *Qiaquick gel extraction kit* (Qiagen) avant d'être ligué selon les indications du fournisseur avec la T4 DNA ligase, pour intégrer les fragments des gènes d'intérêt dans le plasmide voulu. J'ai ainsi obtenu les constructions suivantes :

- TRV2 -*PDS-Nd76* (plasmide TRV2 auquel a été ajouté le fragment de 440pb du gène *PDS* de *N. damascena*)
- TRV2 -*PDS-Cr90* (plasmide TRV2 auquel a été ajouté le fragment de 440pb du gène *PDS* de *C. regalis*)
- TRV2-ANS-*TCP1*-clone10 (plasmide TRV2-ANS auquel a été ajouté le fragment de 224 pb du gène *TCP1*)
- TRV2-ANS-*TCP2*-clone45 (plasmide TRV2-ANS auquel a été ajouté le fragment de 322pb du gène *TCP2*)

J'ai ensuite transformé des *E.coli* DH5 α électro-compétentes avec les constructions obtenues et je les ai mises à pousser à 37°C en milieu LB solide contenant de la rifampicine (protocole identique à celui de l'annexe 3 en changeant le vecteur, le type de bactérie et en utilisant un milieu LB avec 50 mg/L de rifampicine).

Pour obtenir la construction TRV2-ANS-TCPI-TCP2 (plasmide TRV2-ANS-TCP2 auquel a été ajouté le fragment du gène *TCPI*) j'ai fait une double digestion de l'ADN plasmidique du clone d'*E. coli* contenant le plasmide TRV2-ANS-TCPI avec les enzymes Sac1-Xho1 puis je l'ai ligué avec le fragment de *TCP2*. J'ai ensuite transformé des *E.coli* DH5 α électro-compétentes avec ce plasmide comme je l'ai décrit précédemment.

III.6. Séquençage et validation des clones

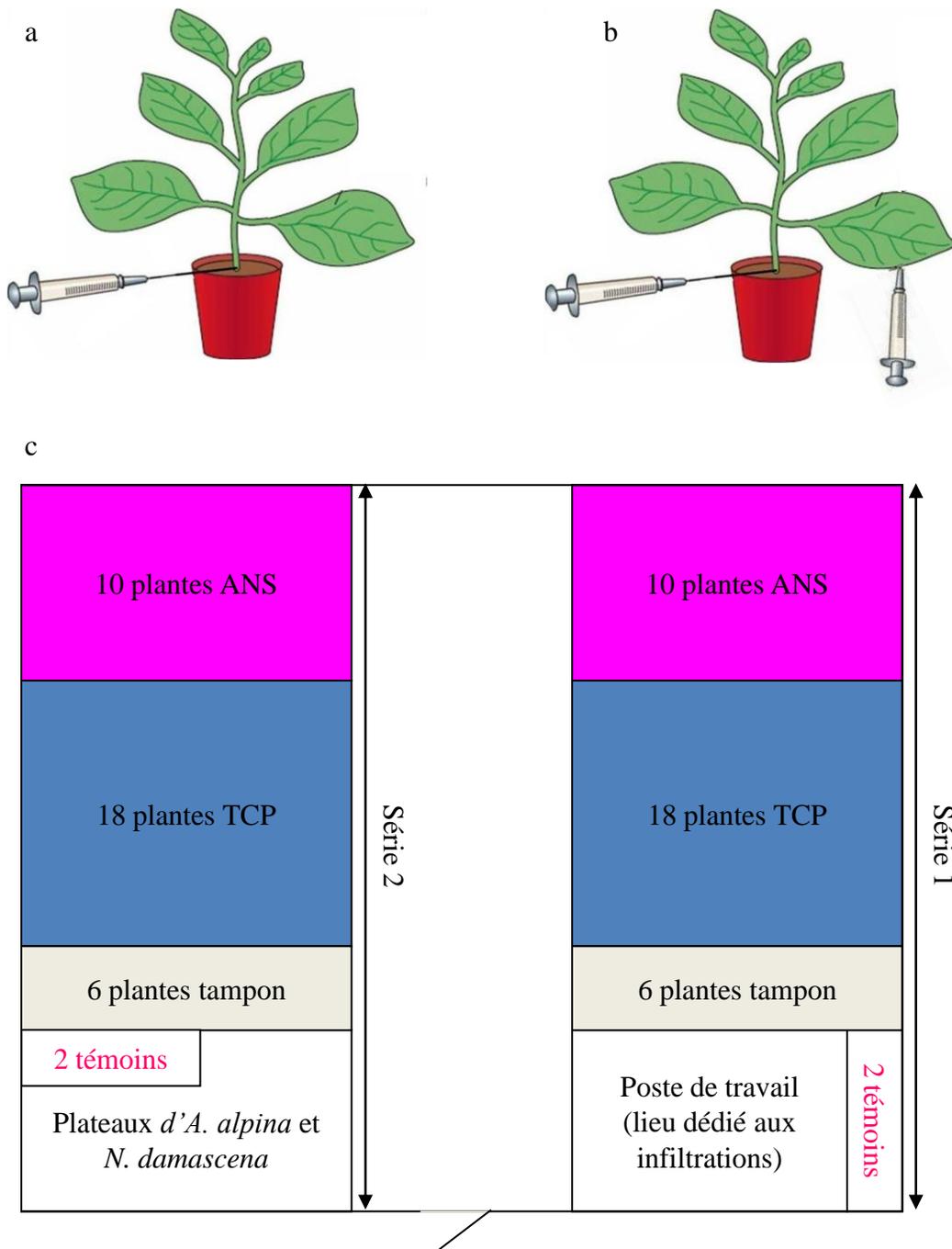
Les colonies obtenues ont ensuite été triées par PCR en utilisant les amorces TRV2-1 et TRV2-2 (tableau I) qui entourent la zone d'insertion des fragments de gènes sur le plasmide TRV2. Les ADN plasmidiques des clones sélectionnés ont été extraits selon le protocole mis en place en routine au laboratoire (annexe 4) puis les clones ont été séquencés avec les amorces TRV2-1 et TRV2-2. Le logiciel Bioedit a permis d'aligner les séquences obtenues avec les séquences de référence pour valider les clones bactériens.

A l'issue de cette étape, 1 clone a été choisi pour chaque construction et un stock glycérol à été fait : TRV2-PDS-Nd76-1, TRV2-PDS-Cr90-1, TRV2-ANS-TCP2-45-1 et TRV2-ANS-TCPI-TCP2-1 (pour la construction TRV2-ANS-TCPI aucune colonie n'a été obtenue).

III.7. Intégration des constructions dans les plasmides TRV2 ou TRV2-ANS et transformation d'*Agrobacterium tumefaciens*

Les ADN plasmidiques des clones TRV2-PDS-Nd76-1, TRV2-PDS-Cr90-1 et TRV2-ANS-TCPI-TCP2-1 ont été utilisés pour transformer des agrobactéries *Agrobacterium tumefaciens* C58 (électro-compétentes) selon le même protocole que celui décrit pour les *E. coli*. Les agrobactéries ont été mises à pousser à 28°C en milieu LB solide contenant de 50 mg/L rifampicine et kanamycine et 25 mg/L de gentamicine. Les colonies obtenues ont été triées par PCR en utilisant les amorces TRV2-1 et TRV2-2.

A l'issue de cette étape, 1 clone a été choisi pour chaque construction et un stock glycérol à été fait : TRV2-PDS-Nd76-1, TRV2-PDS-Cr90-1 et TRV2-ANS-TCPI-TCP2-1.



Figures 14 : Infiltration des 'Origami'.

a: Ces plantes sont notées « - feuilles » car elles ont reçu une injection à la base de la plante.

b: Ces plantes sont notées « + feuilles » car elles ont été infiltrées par injection sur la face abaxiale (sur le dessous) de deux feuilles en plus de la pique à la base de la plante.

c: Plan de la disposition des plantes dans le compartiment de confinement niveau 3.

IV. *Virus Induced Gene Silencing (VIGS)*

I.1. Infiltration des plantes

I.1.1. Culture des agrobactéries

Les bactéries *A. tumefaciens* contenant les plasmides TRV1, TRV2-ANS, TRV2-PDS-Aq (tous les 3 fournis par E. Kramer), TRV2-PDS-Nd76-1, TRV2-PDS-Cr90-1 et TRV2-ANS-TCP1-TCP2-1 (constructions que j'ai réalisées) ont été cultivées pendant 24 heures en milieu LB liquide avec rifampicine, kanamycine et gentamicine. Elles ont ensuite été culottées et re-suspendues à une DO finale de 2 dans du tampon d'infiltration (10mM MES, 200µM acétosyringone, 10mM MgCl₂). Ces bactéries ont été incubées 4 heures à température ambiante puis, juste avant l'infiltration, j'ai mélangé (volume à volume) les bactéries contenant le plasmide TRV1 avec les bactéries contenant le plasmide TRV2 dans lequel ont été clonés les fragments des gènes à inhiber (protocole détaillé en annexe 5).

I.1.2. Méthodes d'infiltrations

Pour infiltrer les ancolies 'Origami', nous nous sommes inspirés de la procédure publiée par Gould et Kramer (2007) mais nos plantes étant petites nous avons décidé de modifier légèrement ce protocole et de tester deux méthodes différentes illustrées dans les figures 14 a et b.

Toutes les ancolies 'Origami' (hormis les témoins) ont été piquées à la base de la rosette pour leur injecter 1mL du mélange d'agrobactéries à une DO de 2 (ou de tampon d'infiltration seul) en utilisant une seringue avec une aiguille de 0,5mm de diamètre.

Dans la première technique d'infiltration, aucune autre injection n'a été faite. Les plantes ont été notées « - feuilles ».

La seconde technique ajoute une infiltration par les feuilles. On injecte 1mL supplémentaire d'agrobactéries (ou de tampon d'infiltration) sur la face inférieure de deux feuilles par plante. Pour cela on utilise une seringue sans aiguille. Les plantes traitées ainsi ont été notées « + feuilles ».

Au total on a réparti équitablement sur 2 tabliers : 4 plantes témoins, 12 plantes infiltrées avec le tampon d'infiltration seul, 20 plantes infiltrées avec la construction TRV2-ANS et 36 plantes infiltrées avec la construction TRV2-ANS-TCP1-TCP2 (figure 14 c). Les plantes de

chacun des tablars ont été infiltrées à une journée d'intervalle et chaque semaine pendant 6 semaines.

Les plantes au stade 3-4 feuilles d'*A. alpina* et *N. damascena* ont été déterrées puis plongées dans la solution de bactéries et infiltrées sous vide selon le protocole mis en place en routine au laboratoire de Versailles (voir annexe 6). Les plantes ont ensuite été repotées en barquette contenant jusqu'à 8 plantes. Au total, nous avons 129 plantes d'*A. alpina* (dont 30 plantes infiltrées avec la construction TRV2-ANS-TCPI-TCP2 et 33 plantes infiltrées pour chacune des constructions TRV2-PDS-Aq, TRV2-PDS-Nd et TRV2-PDS-Cr) et 84 plantes de *N. damascena* (dont 12 plantes témoins, seulement déterrées et repotées, 12 plantes infiltrées avec le tampon seul, 30 plantes infiltrées avec le plasmide TRV2 et 30 avec la construction TRV2-PDS-Nd).

I.2. Culture des plantes en serre de niveau 3 de confinement

La technique du VIGS utilise un plasmide de virus transmissible par contact, par l'eau ou par l'intermédiaire d'insectes (Matthews R.E.F, 1980), il faut donc la réaliser dans un compartiment de niveau 3 de confinement afin d'éviter la propagation du virus à d'autres plantes de la serre ce qui pourrait fausser les résultats des autres expériences. Ce type de compartiment est maintenu à une pression négative par rapport aux zones voisines. De plus, l'eau et l'air qui sortent du compartiment sont filtrés et les quelques manipulateurs autorisés à y entrer doivent porter une sur-blouse, des sur-chaussures et des gants jetables.

I.2.1. Culture des 'Origami'

Compte tenu de la place dont nous disposions, nous avons fait au mieux pour répartir les plantes de manière à éviter les contacts entre elles. Dès les premières infiltrations, les plantes ont été arrosées au pied en prenant garde à ne pas créer d'éclaboussures et en évitant de toucher les pots. Toutefois, les plantes étaient regroupées sur deux tablars qui collectaient l'ensemble des eaux excédentaires. Si la manipulation des pots s'avérait nécessaire, il fallait changer de gants pour ne pas transférer d'agrobactéries d'un type de plante à un autre (par exemple une plante témoin ne devait pas être touchée après une plante infiltrée avec la construction TRV2-ANS).

I.2.2. Culture des *A. alpina* et *N. damascena*

Les *A. alpina* et *N. damascena* ont été cultivées dans le même compartiment que les 'Origami'. Les plantes étaient regroupées par type de construction dans des plateaux recouverts d'une mini-serre pour éviter la transmission par contact pendant les 2 semaines qui suivirent l'infiltration.

Au cours de la culture, nous avons eu des problèmes avec des insectes qui se sont multipliés (des thrips et des mouches des terreaux). Les barquettes d'*A. alpina* et de *N. damascena* ont été infestées de larves qui se sont nourries des racines de nos plantes.

Les ancolies sont particulièrement sensibles à ces larves, j'ai donc nettoyé les racines à l'eau puis repiqué les plantes pour essayer de limiter le taux de mortalité. Les nigelles possèdent un système racinaire bien plus développé que les ancolies, elles n'ont donc pas été repiquées car elles ne semblaient pas être affectées outre mesure par la prolifération des larves.

I.3. Phénotypage des plantes

I.3.1. Définitions des simplifications de langage utilisées par la suite

Les plantes non infiltrées seront appelées par la suite « plantes témoins », celles infiltrées par le tampon d'infiltration seul seront appelées « plantes tampon » et celles infiltrées avec le plasmide TRV2 sans insert seront appelées « plantes TRV2 ».

Les plantes infiltrées avec les agrobactéries contenant le plasmide TRV2 avec le fragment du gène *PDS* d'*A. vulgaris*, de *N. damascena* ou de *C. regalis* seront appelées, respectivement, « plantes *PDS-Aq* », « plantes *PDS-Nd* » ou « plantes *PDS-Cr* ».

Les plantes infiltrées avec le plasmide TRV2-*ANS* seront appelées « plantes *ANS* » et celles infiltrées par le plasmide TRV2-*ANS-TCP1-TCP2* seront appelées « plantes *TCP* ».

Le terme « plantes *PDS*_s⁺ » désignera les plantes dont les feuilles ont été blanchies par l'inhibition du gène *PDS*.

Les fleurs qui sont morphologiquement différentes des fleurs témoins (sans tenir compte de la couleur) seront désignées par le terme « fleurs avec phénotype ».

Le terme « fleurs *ANS*_s⁺ » désignera les fleurs blanchies par l'inhibition du gène *ANS* et « fleurs *ANS*_s⁻ » celles qui ne le sont pas.

I.3.2. Fréquence des notations

Pour l'expérience de VIGS sur 'Origami' aucune notation n'a été faite avant le 23 Mars (soit 25 jours après la première infiltration), date d'apparition des premières fleurs blanches. Après cette date, les notations ont été faites tous les jours de la semaine et parfois le week-end pour ne pas avoir plus de deux jours entre deux séries de notations, afin d'éviter que les fleurs ne fanent sans avoir été notées. A partir du 14 Mai il a été décidé qu'un nombre suffisant d'informations avaient été collectées sur l'ensemble des fleurs et que donc je pouvais me concentrer sur la notation des fleurs *ANSs+* et/ou avec phénotype.

Pour l'expérience de VIGS sur *N. damascena* et *A. alpina*, la date de première visualisation de l'effet du VIGS a été notée et le nombre de « plantes *PDSs+* » a été compté au bout de 35 jours après l'infiltration des plantes.

I.3.3. Protocole des notations

Au début de l'expérience de VIGS sur 'Origami', nous ne savions pas précisément quel serait l'effet de l'inhibition de nos gènes d'intérêt. Nous avons donc noté un maximum d'information. En plus de prendre en photo chacune des fleurs approximativement au même stade (c'est-à-dire quand la fleur était pleinement épanouie mais avant l'anthèse (la libération de pollen)), de noter leur position sur la plante (annexe 7) et le jour de la photo, j'ai aussi compté le nombre de chaque organe les constituant (nombre de sépales, pétales, étamines et carpelles) et si elles étaient *ANSs+* et/ou avec phénotype (annexe 8).

I.4. Observations microscopiques

Des tissus frais des sépales, pétales et étamines des fleurs 'Origami' ont été prélevés pour être analysés au microscope électronique à balayage (MEB). Ces observations ont été faites sur la face adaxiale de 22 fleurs au total dont 2 fleurs témoins, 7 fleurs issues de plantes *ANS* et 13 fleurs issues de plantes *TCP*.

Afin d'éviter que les cellules ne soient abimées, les observations au MEB ont été faites dans l'heure qui suivait le prélèvement des organes. Les fragments d'organes frais ont été montés sur un support en aluminium avec un adhésif double-face puis étudiés avec le MEB Hirox SH1500 à 15 kvolts.

V. Analyse par RT-PCR semi-quantitative de l'expression des gènes d'intérêt

V.1. Prélèvements en serre

Différents organes de chacun des types de plantes ont été prélevés en serre puis congelés à l'azote liquide afin de réaliser ultérieurement des analyses par PCR et RT-PCR.

Sur les plantes 'Origami', j'ai prélevé les différents organes des fleurs avant anthèse (sécales, pétales, étamines et carpelles) tandis que sur les *A. alpina* et *N. damascena* ce sont les feuilles qui ont été prélevées.

Pour les fleurs de type témoin ou ANSs+ (ayant le gène ANS inhibé), j'ai regroupé tous les sécales d'une même fleur dans un tube de 1,5 mL, tous les pétales dans un autre tube et ainsi de suite pour les étamines et les carpelles. Pour les fleurs avec phénotype, j'ai isolé chacun des organes présentant une anomalie dans des tubes de 1,5 mL différents.

Plusieurs feuilles de différentes plantes d'*A. alpina* ou de *N. damascena* ont été prélevées en mélange pour remplir plusieurs tubes de 1,5 mL par type de construction.

Après chaque prélèvement, les tubes ont été plongés dans de l'azote liquide puis conservés au congélateur -80°C.

V.2. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux d' 'Origami', d'*A. alpina* et de *N. damascena* ont été extraits à partir des prélèvements effectués en serre avec le protocole d'extraction d'ARN utilisé en routine au laboratoire (annexe 9).

Ces ARN ont ensuite été traités à la DNase (Invitrogen) pour éliminer l'ADN génomique qui aurait pu être extrait en même temps que les ARN. Une transcription inverse (*Reverse Transcription*, RT) a ensuite été réalisée avec la Superscript II selon les instructions du fabricant (Invitrogen) avec des oligos dT pour permettre la synthèse des ADN complémentaires (ADNc) des ARN messagers extraits des plantes.

V.3. PCR semi-quantitative

Les PCR semi-quantitatives ont été réalisées afin de comparer le niveau d'expression des gènes d'intérêt selon les types de plantes (témoins, tampons, TRV2, ANS, TCP ou PDS).

Les ADNc ont été utilisés pour réaliser des amplifications avec la Taq DNA polymérase selon les indications du fournisseur (Invitrogen). Les dilutions des ADNc ont été ajustées (de 1/2 à 1/80) en utilisant le gène de l'*ACTINE* comme contrôle interne pour uniformiser les quantités

d'ADNc de chaque échantillon. L'*ACTINE* a été utilisé comme référence car c'est un gène constitutif dont la séquence est conservée d'une espèce à l'autre chez les plantes. De plus, son niveau d'expression est supposé constant et reflète la quantité d'ADNc. Des mises au point ont été réalisées sur chacun des gènes d'intérêt afin de définir les conditions optimales d'amplification. Les nombres de cycles ont été choisis pour correspondre à la phase exponentielle de la PCR. Les amplifications de l'*ACTINE* (amorces Aq Actine-2 et Aq Actine-1) et de *PDS* (amorces PDS-F2A, F2N, F3A ou F3N et PDS-R2A, R2N, R3A ou R3N) ont été effectuées avec 28 cycles successifs de dénaturation à 94°C, hybridations des amorces à 55°C et élongation à 72 °C (amorces dans le tableau I).

L'amplification d'*ANS* (amorces AqvANS-F et AqvANS-R) a été effectuée avec 30 cycles successifs de dénaturation à 94°C, hybridations des amorces à 55°C et élongation à 72 °C (amorces dans le tableau I).

Les amplifications de *TCP1* (amorces FoAa1 et ReAa1) et de *TCP2* (amorces FoAa2 et ReAa2) ont été effectuées avec 30 cycles successifs de dénaturation à 94°C, hybridations des amorces à 50°C et élongation à 72 °C (amorces dans le tableau I).

VI. *Analyses statistiques*

Des tests de comparaison de moyenne (test de Student) et de comparaison de fréquence (test de Chi²) ont été effectués sur les données relevées entre le 23 Mars et le 14 Mai, c'est-à-dire dans la période où toutes les fleurs ont été notées.

Le test de Student a été effectué pour comparer le nombre moyen des différents organes présents sur les fleurs témoins par rapport aux fleurs tampons, les fleurs des plantes infiltrées « + feuilles » par rapport aux plantes infiltrées « - feuilles » ; les fleurs tampon par rapport aux fleurs TCP+ANS et les fleurs TCP par rapport aux fleurs ANS.

Le test de Chi² a été réalisé pour comparer la fréquence des fleurs ANSs+ (blanches) chez les plantes infiltrées « + feuilles » par rapport aux plantes infiltrées « - feuilles » et chez les plantes ANS par rapport aux plantes TCP. Ce test a aussi été réalisé pour comparer la fréquence des fleurs avec phénotype chez les plantes infiltrées « + feuilles » par rapport aux plantes infiltrées « - feuilles », chez les plantes ANS par rapport aux plantes TCP et chez les fleurs ANSs+ (blanches) par rapport aux fleurs ANSs-.

Les valeurs statistiques ont été considérées comme significatives pour un seuil inférieur ou égal à 5%.

Tableau 1bis : Evaluation du coût de l'expérimentation mise en œuvre

Dans ce tableau sont regroupées les informations concernant les différentes étapes clés de mon stage. Pour chacune de ces étapes j'ai noté la durée, le coût, les personnes qui m'ont aidées, la proportion de leur implication dans ce travail ainsi que mon implication personnelle.

(1) Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB), INRA, Versailles.

(2) UMR de génétique végétale, INRA, Ferme du moulon, Gif sur Yvette.

(A) le temps indiqué correspond à la durée totale d'occupation des chambres de culture, de vernalisation et de la serre de confinement.

(B) nombre réel d'infiltration pendant ces 36 jours: 12 car j'ai fait 2 infiltration par semaines (1 pour chaque série de plante)

(C) le temps indiqué correspond à la période pendant laquelle des notations ont été faites. Le temps réel de notations par jour à varié de 1 à 10 heures.

(D) le temps réel d'utilisation du MEB par jour à varié de 30 minutes à 3 heures sur 9 jours au total.

Projet-Intitulé	Durée	Coût (en euros)	Autres personnes	Implication des autres personnes	Implication personnelle
Réalisation des constructions	47 jours	3200,00	Laufs P. (1)	conseils techniques	100%
Culture des plantes	215 jours (A)	4000,00	Ferry H. (1)	90%	10%
Infiltrations	36 jours (B)	170,00	Laufs P. (1)	aide lors des infiltrations sous vide	100%
Notations, photographies, prélèvements	71 jours (C)		Ferry H. (1)	installation du fond noir pour faire les photographies	100%
Microscopie (MEB)	18 heures (D)	360,00	Laufs P. (1)	40%	60%
extractions ARN, RT-PCR	45 jours	1500,00			100%
Analyses statistiques	2 jours		Rousselle Y. (2)	50%	50%

Cout total du projet 9230,00 Euros

VII. *Coûts du stage*

Une estimation du coût de l'ensemble des manipulations présentées précédemment à été effectuée. Pour cela, j'ai tenu compte du prix de la location des différentes serres utilisées pour la culture des plantes, du coût de l'utilisation du microscope électronique à balayage et du coût des différents produits nécessaires pour toutes les manipulations de biologie moléculaire. En revanche, je n'ai pas tenu compte du coût de l'amortissement des appareils déjà présents au laboratoire (appareil photo, machines PCR, étuves, ordinateur, etc...). Le coût total estimé s'élève à 9230 euros. Toutes ces données sont résumées dans le tableau 1bis.

Dans ce même tableau, j'ai aussi essayé d'estimer le temps que d'autres personnes avaient pu passer à m'aider sur ce projet.

Résultats:

Il a été montré que la zygomorphie (symétrie bilatérale) des fleurs de l'espèce modèle *Antirrhinum majus* est déterminée par l'interaction de 4 facteurs de transcription. Le plus important d'entre eux est codé par le gène *CYCLOIDEA*, dont les gènes *TCP* identifiés chez l'ancolie sont les homologues.

Lors de sa thèse, F. Jabbour a mis en évidence l'expression de ces gènes *TCP* dans les organes floraux de plusieurs espèces zygomorphes et actinomorphes à un stade précoce du développement. L'ancolie à des fleurs actinomorphes, exprime les gènes *TCP* (F. Jabbour, 2009) et c'est aussi la seule Renonculacée pour laquelle la méthode du « *Virus Induced Gene Silencing* » (*VIGS*) est opérationnelle (Gould et Kramer, 2007). Cette technique se base sur l'interférence à ARN et permet d'inhiber l'expression d'un gène endogène de la plante grâce à l'infection de cette plante par un virus ayant intégré dans son génome un fragment de la séquence du gène d'intérêt. L'infection virale entraîne un mécanisme de défense chez la plante qui va produire des petits ARN dirigés contre le virus et contre la séquence d'intérêt qu'il contient. Cette réaction va entraîner une réduction du niveau d'expression du gène ciblé ce qui devrait être visualisé par un phénotype directement observable sur la plante.

Nous avons utilisé la méthode du *VIGS* pour essayer de déduire le rôle des gènes *TCP* de l'ancolie sur la morphologie de la fleur. On a recherché une corrélation entre le (les) phénotype(s) observé(s) lors de l'inhibition des gènes *TPC* et leur niveau d'expression révélé par RT-PCR semi-quantitative.

I. Inhibition des gènes *TCP* chez l'ancolie par la technique du *VIGS*

I.1. Obtention des séquences codantes des gènes *TCP*

Le gène *CYCLOIDEA* trouvé chez *Antirrhinum majus* comporte des domaines conservés spécifiques qui ont été utilisés pour caractériser des gènes homologues chez différentes espèces de Renonculacées. Au cours de sa thèse, F. Jabbour a identifié 2 gènes homologues de *CYCLOIDEA* chez *Aquilegia alpina* appelés gènes *TCP1* et *TCP2* dans ce rapport.

Bien qu'*A. alpina* et *A. coerulea* 'Origami' soient deux espèces différentes d'*Aquilegia*, on a considéré que la séquence des gènes étaient conservée au sein d'un même genre et j'ai donc

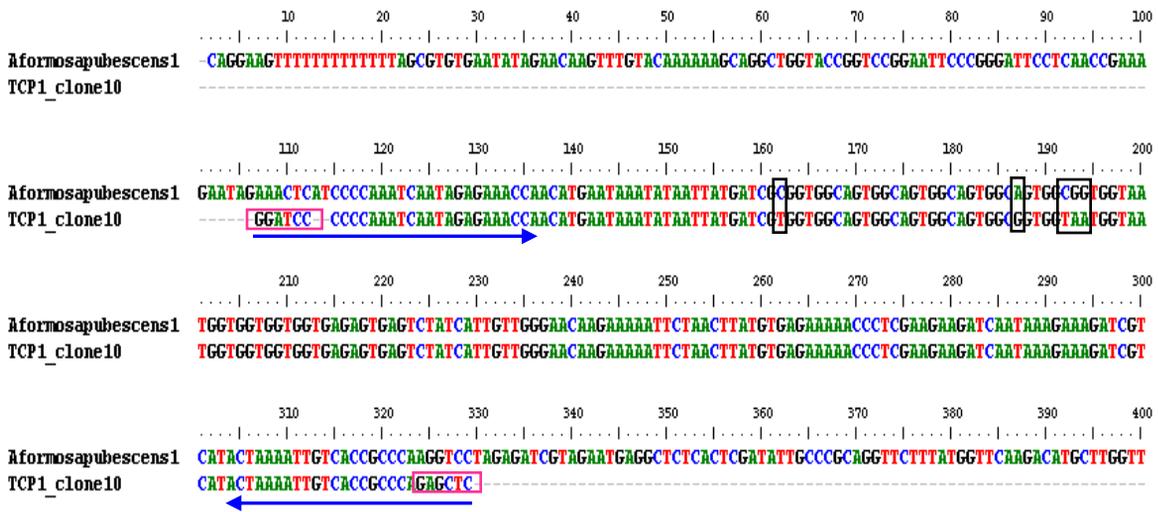


Figure 15 : Comparaison de séquences du gène TCP1 d' *A. formosa x pubescens* et d' *A. caerulea* 'Origami':

La séquence obtenue par blast sur le site NCBI et correspondant à la séquence trouvée par F. Jabbour est notée « Aformosapubescens1 ». La séquence que j'ai obtenue par PCR sur 'Origami' est notée « TCP1-clone10 » et correspond au fragment inséré dans les plantes. Les rectangles roses indiquent les sites de restrictions *Bam*HI et *Sac*I des amorces qui ont permis d'amplifier le gène TCP1 (notées par une flèche bleue). Les enzymes de restrictions ont été utilisées pour intégrer le fragment au plasmide TRV2. Les rectangles noirs indiquent les différences entre les 2 séquences.

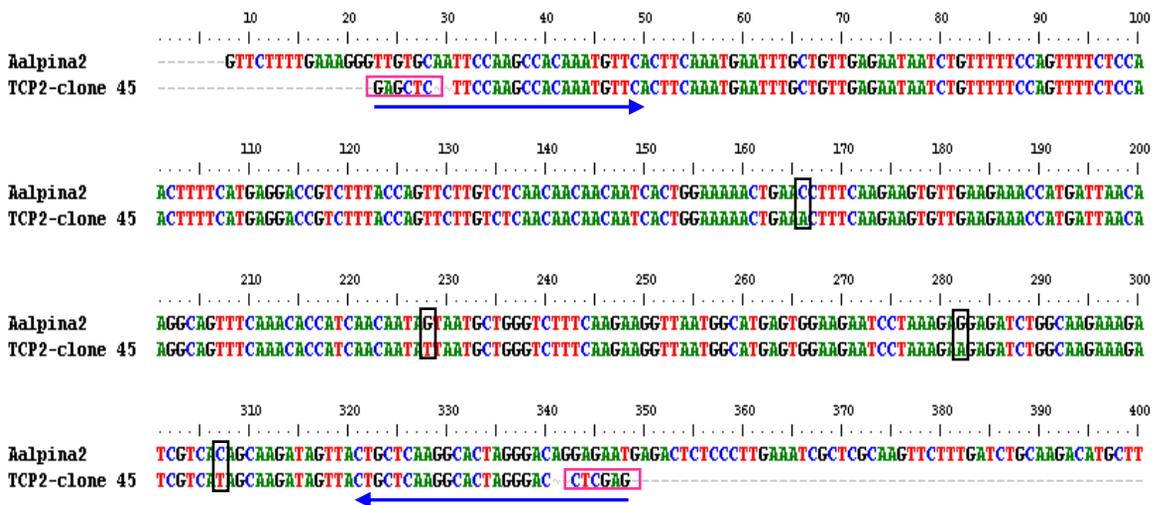


Figure 16 : Comparaison de la séquences du gène TCP2 d'*Aq. alpina* et d'*Aq. caerulea* 'Origami':

La séquence obtenue par F. Jabbour sur *Aq. alpina* est notée « Aalpina2 ». La séquence obtenue par PCR sur 'Origami' est notée « TCP2-clone 45 » et correspond au fragment inséré dans les plantes. Les rectangles roses indiquent les sites de restrictions *Sac*I et *Xho*I des amorces qui ont permis d'amplifier le gène TCP2 (notées par une flèche bleue). Les enzymes de restrictions ont été utilisées pour intégrer le fragment au plasmide TRV2. Les rectangles noirs indiquent les différences entre les 2 séquences.

dessiné plusieurs couples d'amorces directement à partir des séquences de F. Jabbour. Ces amorces ont été choisies dans une zone non conservée entre les deux gènes *TCP* afin d'obtenir une amplification spécifique de chacun des homologues. Les produits PCR obtenus ont été envoyés à séquencer et les séquences ont ensuite été alignées avec celles de F. Jabbour. J'ai trouvé 97% d'identité entre les 2 séquences pour le fragment du gène *TCP1* et 98% pour le fragment du gène *TCP2* (Figures 15 et 16). Ces résultats confirment que j'ai bien amplifié chez 'Origami' les mêmes gènes que F. Jabbour chez *A. alpina*.

I.2. Réalisation et vérification des constructions

Le virus du tabac « *Tabacco Rattle Virus* » a la particularité d'avoir besoin de 2 ARN pour se répliquer. Pour réaliser les constructions pour la méthode du VIGS, chacun de ces ARN est contenu dans un plasmide différent. Nous avons utilisé l'un de ces plasmides pour (TRV2) insérer nos gènes d'intérêt puis nous avons co-injecté les 2 plasmides, par l'intermédiaire d'agrobactéries, dans les plantes. Le virus s'est alors multiplié, la plante a lutté contre l'invasion et, par là-même, a inhibé l'expression de nos gènes d'intérêt.

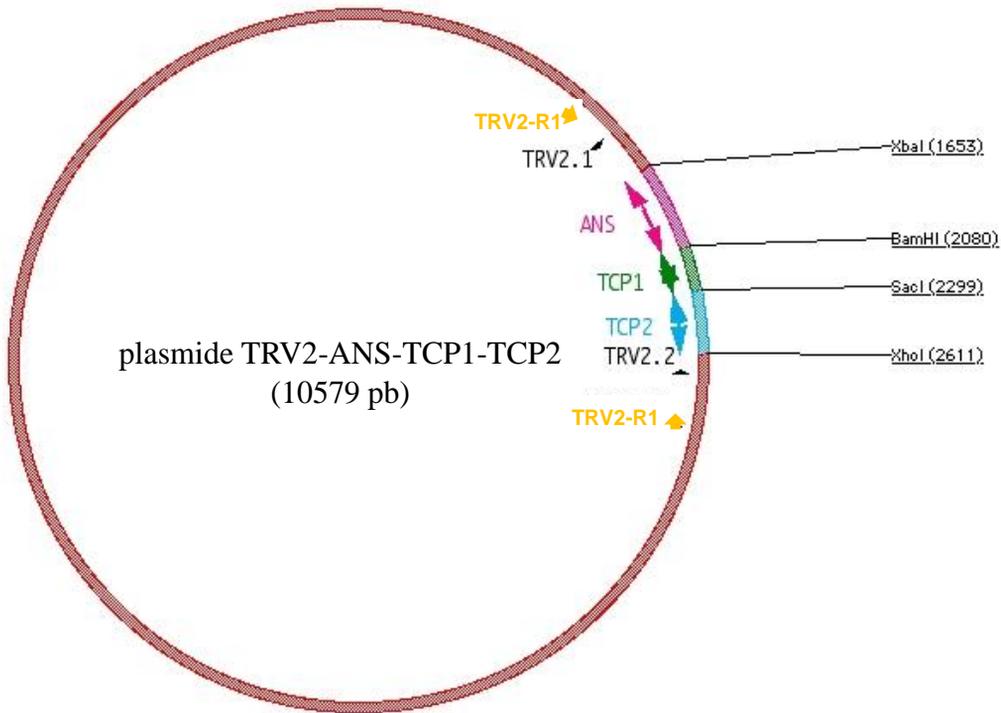
Ce plasmide viral TRV2 nous a été donné par la spécialiste du VIGS sur l'ancolie : E. Kramer de l'Université de Harvard. Elle y a intégré un fragment du gène *ANS* (*ANTHOCYANIDIN SYNTHASE*) d'*A. vulgaris* qui va permettre de visualiser si l'inhibition a fonctionné. En effet, le gène *ANS* joue un rôle dans la synthèse des flavonoïdes puisqu'il contrôle la conversion des leucoanthocyanidines (peu colorées) en anthocyanidines (colorée). Lorsque l'*ANS* est inhibé, on obtient une absence de coloration des fleurs qui apparaissent alors blanches au lieu d'être colorées. Etant donné que le gène *ANS* est un gène conservé et qu'il existe une forte identité entre les différentes espèces d'ancolie, nous avons décidé de garder la construction d'E. Kramer (*A. vulgaris*) au lieu de réamplifier l'*ANS* d'Origami'.

A ce plasmide TRV2-*ANS*, j'ai intégré par clonage un fragment de chacun des gènes *TCP1* et *TCP2* (protocole détaillé en annexes 4 et 5).

A chaque étape permettant d'insérer l'un des fragments de gènes *TCP* au plasmide TRV2-*ANS*, les amorces TRV2-1 et TRV2-2 du plasmide TRV2 (figure 17 a) ont été utilisées pour amplifier et vérifier par séquençage les clones obtenus.

Le séquençage du plasmide final a montré qu'il contenait bien le fragment du gène *ANS* inséré par E. Kramer et les fragments de nos gènes d'intérêts *TCP1* et *TCP2* (figure 17 b).

a



b

```

CAGTTTTTGTATAATTCACCTGGGAGATGATACGCTGTTTTGAGGGAAAAGTAGAGAACGTATTTGTTTTTATG
TTCAGGCGGTTCTTGTGTGTCAACAAAGATGGACATTGTTACTCAAGGAAGCACGATGAGCTTTATTATTA
CGGACGAGTGGACTTAGATTCTGTGAGTAAGGTTACCGAATTCTCTAGA TTGGGATTGGGAAGAAAGGC
TAGAAAAGGAAGTTGGTGGCATGGAAGATTTGCTGTTGCAGCTGAAGATCAATTACTATCCTAAATGCCCA
CAACCAAACTGGCACTCGGTGTTGAAGCCACACTGATGTTAGTGCTCTCACTTTTATAACCCACAACAT
GGTGCCCTGGTTTTGCAAGTTTACATTGATGAAAAATGGGTGACTGCCAAGTGCGTCCCCAACTCTATAATCG
TGCACATTGGAGACACCCTAGAAAATTTGAGCAACCGAAAAGTACAAGAGTATACTGCACAGAGGACTAGTG
AACAAGGAGAAGGTCAGGATCTCGTGGGCGGTTTTCTGTGAGCCACCTAAAGAGAAGATTGTTCTTAAACC
ACTGCCAGAGCTTGTGACCGAGTCAGAGCCAGCACTCTTCCCACCTCGCACATTTGCTCAACATGGATCCC
CCCAATCAATAGAGAAAACCAACATGAATAAATATAATATGATCGTGGTGGCAGTGCCAGTGCCAGTGCC
GGTGGTAATGGTAATGGTGGTGGTGGTGGAGAGTGAGTCTATCATTGTTGGGAACAAGAAAAATTTCTAACTT
ATGTGAGAAAAACCCTCGAAGAAGATCAATAAAGAAAAGATCGTCATACTAAAAATGTCACCGCCAGAGCT
CTTCCAAGCCACAAATGTTCACTTCAAAATGAAATTTGCTGTTGAGAATAATCTGTTTTTCCAGTTTTCTCCA
ACTTTTTCATGAGGACCGTCTTTACCAGTTCTTGTCTCAACAACAACAATCACTGGAAAAACTGAAACTTTC
AAGAAGTGTGTAAGAAAACCATGATTAACAAGGCAGTTTCAAAACCCATCAACAATATTAATGCTGGGTCTT
TCAAGAAGGTTAATGGCATGAGTGGAAAGATCCTAAAGAAGAGATCTGGCAAGAAAAGATCGTTCATAGCAA
ATAGTTACTGCTCAAGGCACTAGGGACCTCGAGGCCCGGCATGTCCCGAAGACATTAAACTACGGTTCTT
TAAGTA
  
```

Figures 17 : Construction TRV2-ANS-TCP1-TCP2

a: Schéma du plasmide TRV2 dans lequel on a intégré les fragments des gènes ANS (en rose), TCP 1 (en vert) et TCP 2 (en bleu) grâce aux sites de restriction indiqués sur la droite du schéma. Le couple d'amorces noté en noir (TRV2-1 et TRV2-2) ont été utilisés pour vérifier les constructions .

b: Séquence du clone TRV2-ANS-TCP1-TCP2-1 après vérification .

Fragment du plasmide TRV2 amplifié avec les amorces TRV2-1 et TRV2-2. Les parties noires de la séquence correspondent à la séquence du plasmide TRV2. Les zones colorées correspondent aux différents fragments de gènes qui ont été insérés dans le plasmide TRV2. En rose on retrouve le gène ANS, en vert le gène TCP1 et en bleu le gène TCP2.

I.3. Observations

I.3.1. Fleurs des plantes témoins

Les fleurs des plantes témoins sont constituées de pièces florales insérées en spirale (cas des sépales) ou sur des cercles concentriques avec, de l'extérieur vers l'intérieur, 5 sépales rouges, 5 pétales bicolores en forme de cornet avec un éperon recourbé (blanc en haut du cornet et rouge sur l'éperon), en moyenne 65 étamines et des staminodes qui entourent 5 carpelles (figure 18a). Parfois seuls 4 sépales et 4 pétales sont présents (1 cas sur 40 plantes).

J'ai aussi observé certains organes floraux au microscope électronique à balayage (MEB).

D'après les résultats publiés par E. Kramer (Kramer et al., 2007), la distinction des types cellulaires des organes est plus facile du côté adaxial c'est pourquoi nous nous sommes focalisés sur ce côté uniquement.

Les cellules de sépales des fleurs témoins sont très bombées (figure 19e) tandis que les cellules de pétales sont plus plates (figure 19f). Les cellules des filets des étamines sont longilignes (figure 20f). Nous n'avons pas regardé l'aspect des cellules des staminodes ou des carpelles.

I.3.2. Fleurs des plantes infiltrées avec le tampon d'infiltration

Les fleurs des plantes infiltrées par du tampon d'infiltration seul avaient la même morphologie que les fleurs des plantes témoins (figure 18a). Aucune fleur blanche n'a été observée sur ces plantes. Parfois seuls 4 sépales et 4 pétales sont présents (2 cas sur 38 plantes).

Afin de voir si le tampon d'infiltration a eu un effet au niveau des cellules des fleurs, nous avons observé les sépales et les pétales au microscope électronique à balayage (MEB).

Les résultats ont été les mêmes sur les plantes infiltrées avec le tampon d'infiltration seul que sur les plantes témoins indiquant que le tampon n'a pas d'effet sur la morphologie des fleurs.

I.3.3. Effet du tampon sur le nombre d'organes

Pour voir si le tampon d'infiltration avait un rôle sur le nombre d'organes des fleurs, j'ai compté sur 40 fleurs témoins et 38 fleurs tampons le nombre de sépales, pétales, étamines et carpelles (voir exemple de notations en annexe 7). Pour chacune de ces données j'ai ensuite

Tableau II: Comparaisons de moyennes du nombre d'organes chez les fleurs des plantes témoins et tampons. La valeur significative du test de Student est notée en jaune.

	Plantes témoins moyenne (e.t.) (40 fleurs)	Plantes tampons moyenne (e.t.) (38 fleurs)	Test de Student (Pvalue)
Sépales	4,96 +/- 0,19	4,94 +/- 0,24	0,6541
Pétales	4,96 +/- 0,19	4,97 +/- 0,18	0,9254
Etamines	64 +/- 6,70	59,59 +/- 4,43	0,0055
Carpelles	5,14 +/- 0,52	5,27 +/- 0,65	0,3861

réalisé un test de comparaison de moyennes entre les nombres d'organes des fleurs témoins et ceux des fleurs tampons (tableau II). Le test de Student n'a révélé aucun effet du tampon d'infiltration sur le nombre de sépales, pétales et carpelles mais il a montré que les plantes témoins ont significativement plus d'étamines que les plantes tampons (respectivement 64 et 59,59 étamines, $P_{\text{value}}=0,0055$). Le tampon a donc un effet sur le nombre d'étamines.

I.4. Effet de l'inhibition des gènes *ANS* et *TCP* sur la morphologie florale

I.4.1. Description des phénotypes observés

I.4.1.1. *Observation des fleurs entières*

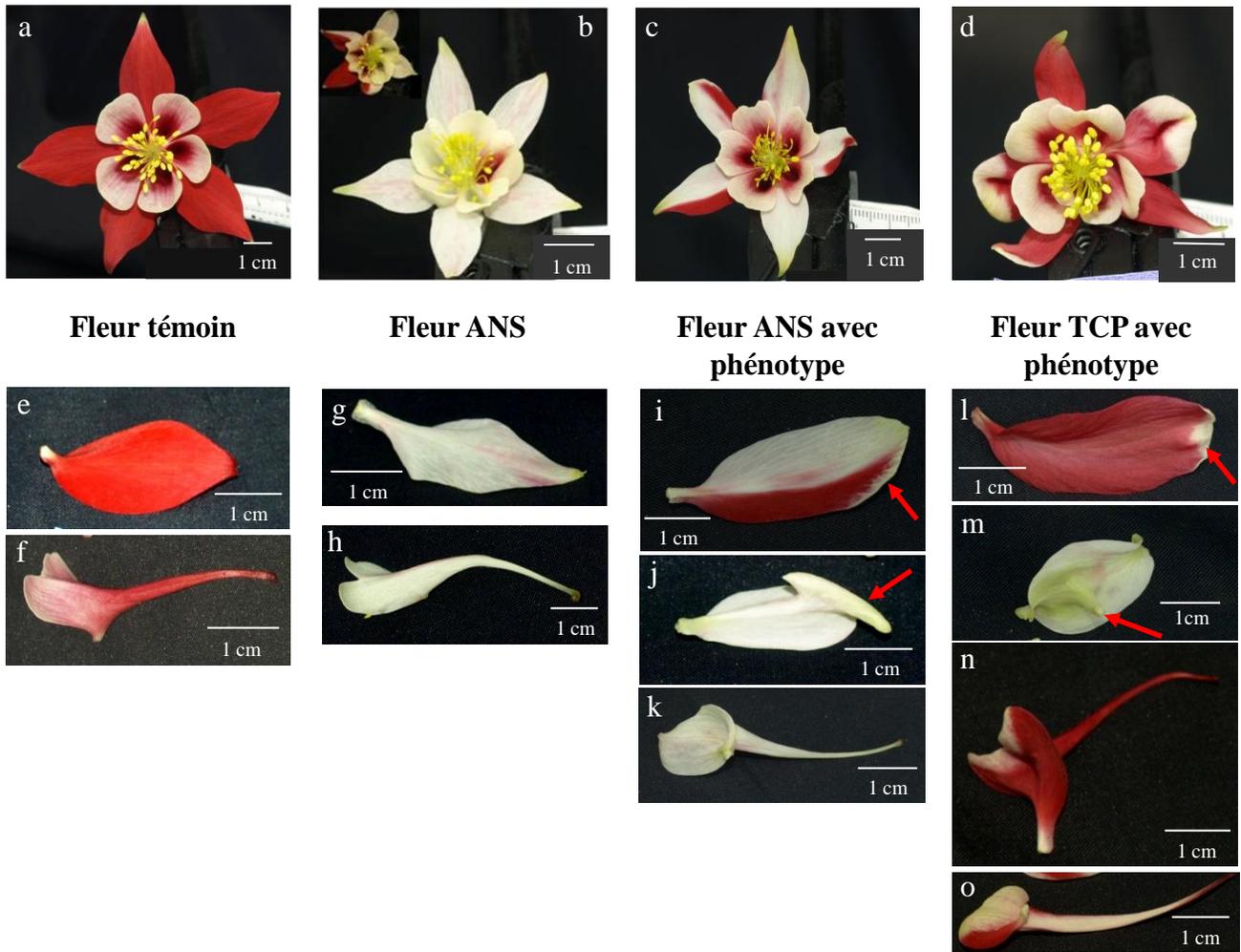
Des fleurs blanches ont été observées sur les plantes ANS et TCP, elles étaient soit partiellement blanches soit entièrement blanches comme illustré sur la figure 18b. Ce blanchiment est le signe que le gène *ANS* a été inhibé (Gould et Kramer, 2007). Ces fleurs blanches seront appelées « fleurs *ANS*⁺ » dans la suite de ce rapport.

Des fleurs différentes des fleurs témoins ont aussi été observées. Elles seront appelées « fleurs avec phénotype » dans la suite du rapport. Ces phénotypes ont principalement touchés les sépales mais certaines étamines ont, elles aussi, présenté un aspect anormal. Dans certains cas, seule l'extrémité du sépale est modifiée en une zone blanchâtre et arrondie et dans d'autres, les sépales ont des formes que j'appellerai « pétaloïdes » car ils ressemblent plus à un pétale qu'à un sépale. Sur chaque fleur avec phénotype, le nombre de sépales touchés a varié de 1 à 4 avec parfois un « gradient » de transformation du sépale. Par exemple sur la figure 18d, on peut voir que cette fleur à 3 sépales anormaux dont 2 ressemblent à des pétales et 1 a une extrémité blanchâtre et arrondie.

Ces fleurs avec phénotype n'ont pas été observées sur les plantes témoins ou les plantes tampons mais certaines fleurs des plantes ANS présentaient ces caractéristiques (figure 18c).

I.4.1.2. *Observations au microscope électronique à balayage (MEB)*

Afin de voir si les modifications observées pouvaient être associées à une modification du type cellulaire, nous avons observé les différents organes de la fleur au microscope électronique à balayage (MEB).



Fleur témoin

Fleur ANS

**Fleur ANS avec
phénotype**

**Fleur TCP avec
phénotype**

Figure 18 : Morphologies des fleurs d'*Aquilegia coerulea* 'Origami'

a à d: Photographies de fleurs entières.

a: Fleur témoin, b: Fleur contenant la construction TRV2-ANS,

c: Fleur contenant la construction TRV2-ANS et présentant un phénotype,

d: Fleur contenant la construction TRV2-ANS-TCP1-TCP2 et présentant un phénotype,

e à o: Photographies de sépales et de pétales. e: sépale et f: pétale d'une fleur témoin

g: sépale et h: pétale d'une fleur TRV2-ANS où l'ANS est fortement inhibé,

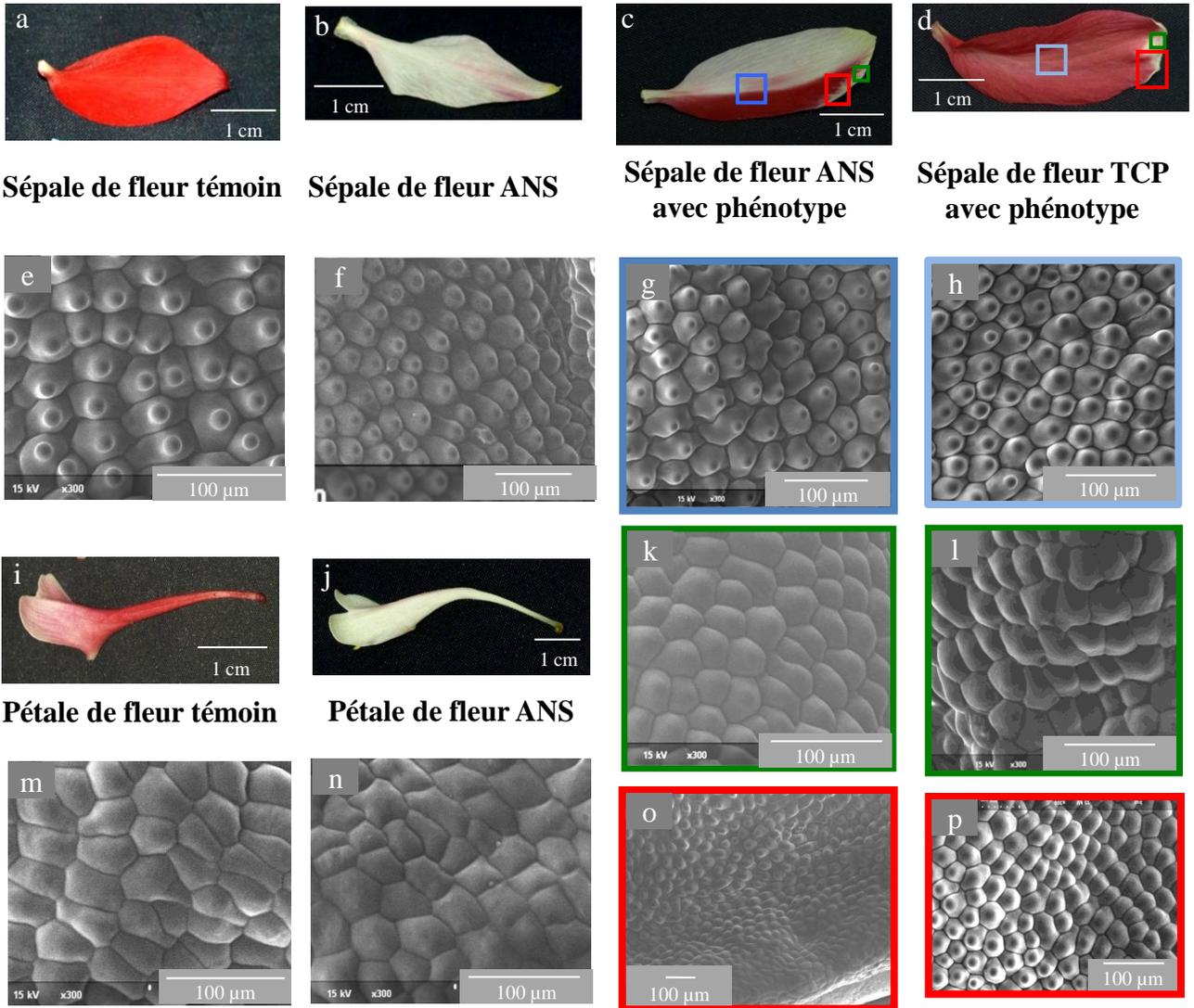
i à k: sépales de différentes fleurs TRV2-ANS avec de haut en bas un niveau croissant de conversion de sépale en pétale.

l à o: sépales de différentes fleurs TRV2-ANS-TCP1-TCP2 avec de haut en bas un niveau croissant de conversion de sépale en pétale.

i et l: sépales avec un bord blanchâtre légèrement gaufré, j et m: sépales avec un renflement,

n: sépale avec un éperon mais non complètement transformé en pétale, k et o: sépales

convertis en pétales.



Sépale de fleur témoin

Sépale de fleur ANS

**Sépale de fleur ANS
avec phénotype**

**Sépale de fleur TCP
avec phénotype**

Pétale de fleur témoin

Pétale de fleur ANS

Figure 19 : Morphologies cellulaires des fleurs d'Origami

a, e, i et m: Fleur témoin; b, f, j et n: Fleur contenant la construction TRV2-ANS;

c, g, k et o: Fleur contenant la construction TRV2-ANS-TCP1-TCP2 et présentant des sépales avec phénotype; d, h, l et p: Fleur contenant la construction TRV2-ANS et présentant un sépale avec phénotype,

a à d: Photographies de sépales, i et j: Photographies de pétales

e à h, k, l, o et p : cellules adaxiales de sépales vues au MEB au grossissement x300 (ou x70 pour o et p)

m et n: cellules adaxiales de pétales vues au MEB au grossissement x300,

g et h: cellules normales des zones notées en bleu sur les photos c et d,

k et l: cellules des zones blanchâtres notées en vert sur les photos c et d,

o et p: cellules normales et de type « pétale » des zones notées en rouge sur les photos c et d,

(o: cellules de type « sépale » en haut à droite de la photo et cellule de type « pétale » en bas à gauche;

p: cellules de type « sépale » en bas de la photo et cellule de type « pétale » en haut)

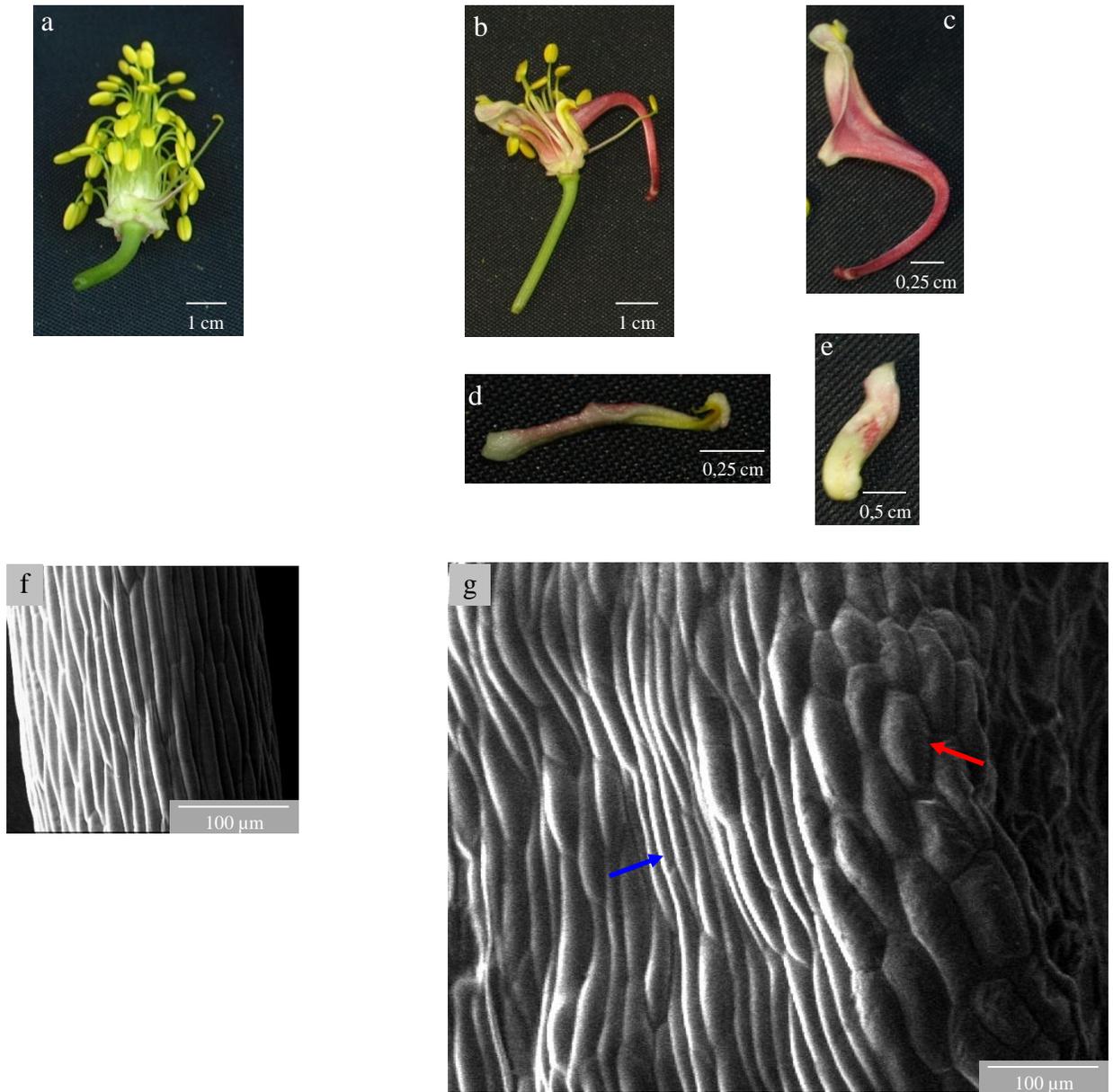


Figure 20 : Morphologies des étamines des fleurs d'« Origami »

a: Photographies d'étamines de fleur témoin,

b à e : Photographies d'étamines de fleur contenant la construction *TRV2-ANS-TCP1-TCP2* et présentant des anomalies,

f: Photographie de cellules du filet d'une étamine de fleur témoin prise au microscope électronique à balayage (MEB) au grossissement x300. Les cellules sont longilignes et étroites.

g: Photographie de cellules d'étamine de type « pétaloïde » prise au microscope électronique à balayage (MEB) au grossissement x100. Il y a un mélange de 2 types cellulaires. Certaines sont plutôt longilignes et étroites (flèche bleue) et d'autres sont petites et plus larges (flèche rouge).

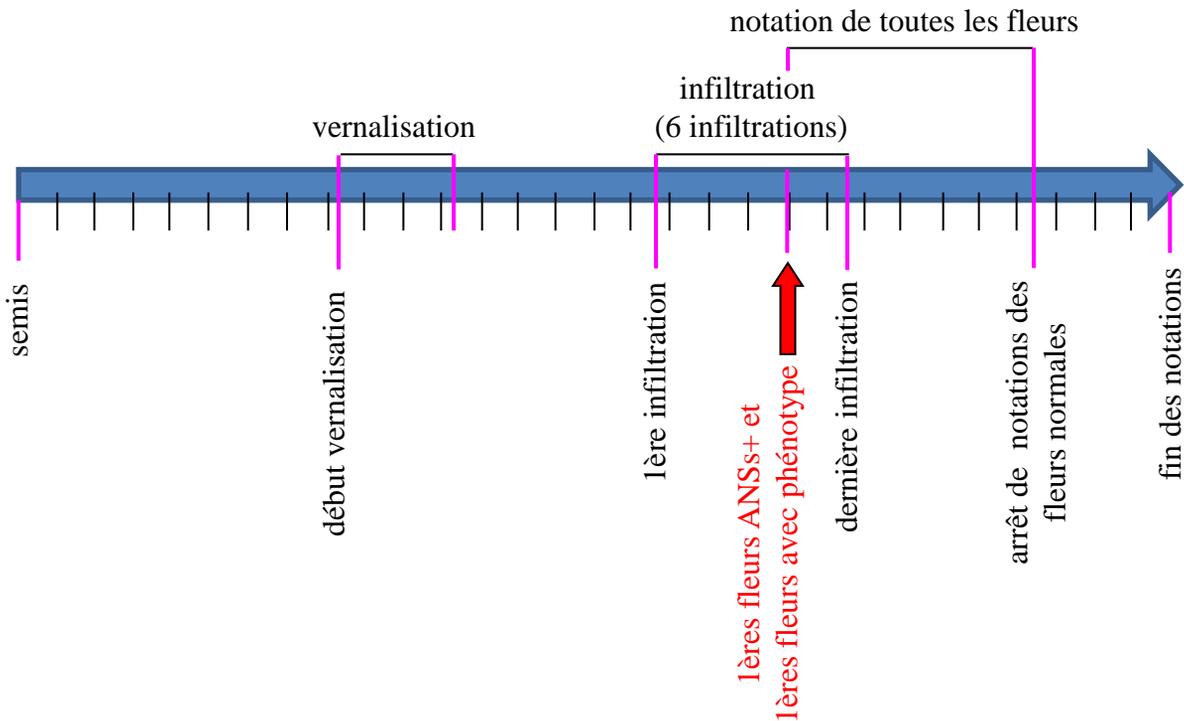


Figure 21: Description de l'expérience de *VIGS* sur les 'Origami' au cours du temps. La distance entre 2 traits noirs verticaux représente une semaine. Du semis à la vernalisation 60 jours se sont écoulés. Du semis à la première infiltration 120 jours se sont écoulés (dont 3 semaines de vernalisation). De la première infiltration à la fin des notations 95 jours se sont écoulés. De la première infiltration à la dernière 5 semaines se sont écoulées. Les premières fleurs ANSs+ sont apparues 25 jours après la première infiltration. Les premières fleurs avec phénotype sont apparues en même temps chez les plantes TCP.

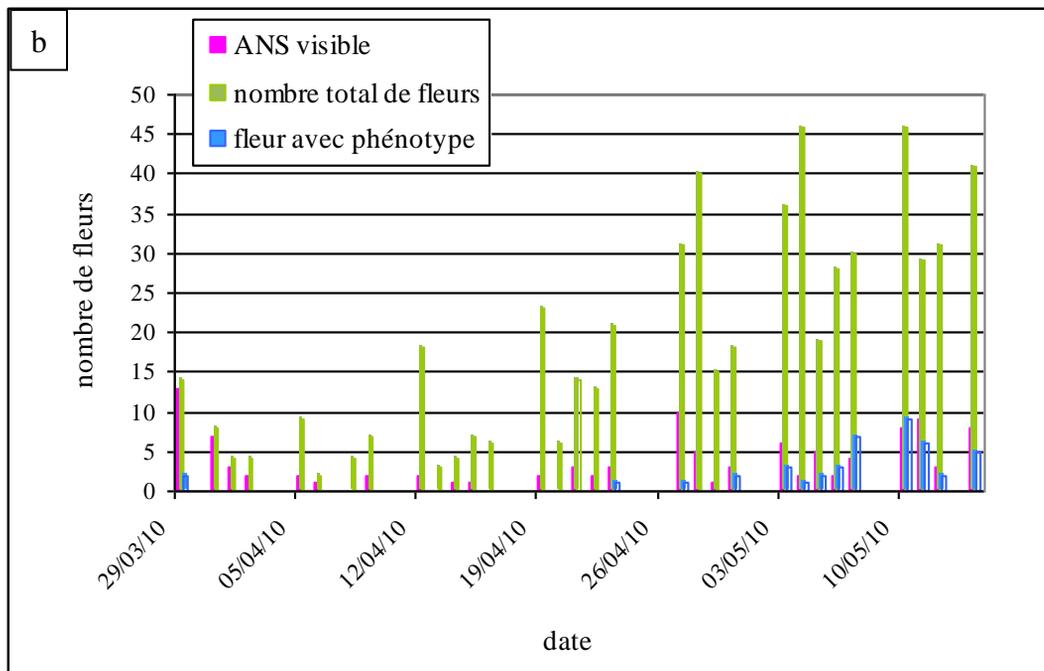
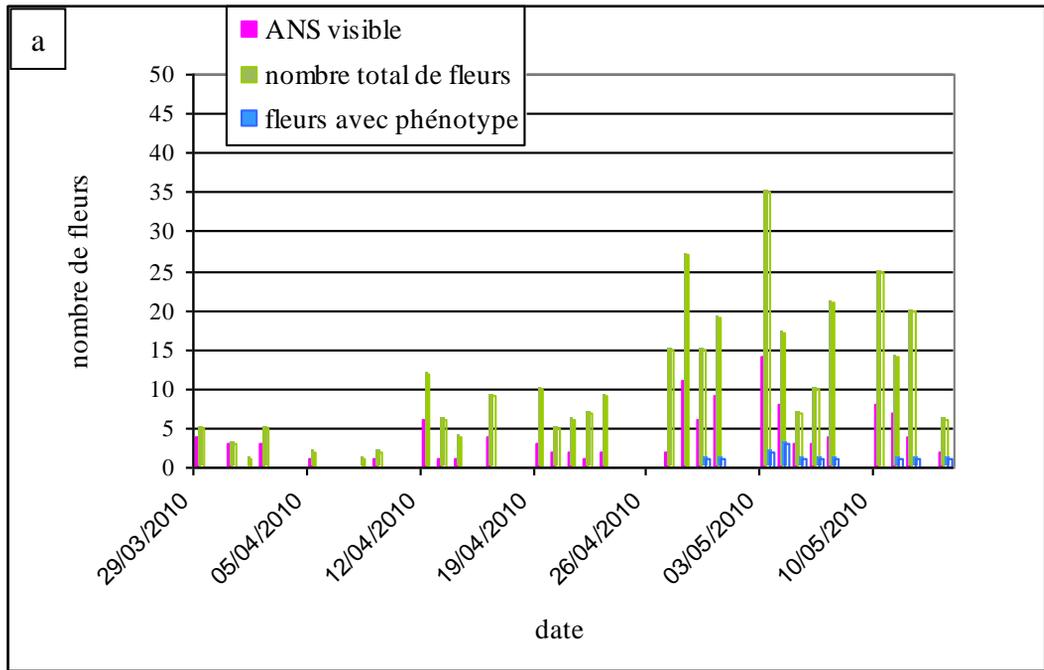


Figure 22: Evolution du nombre de fleur au cours du temps.

a: nombre de fleurs au cours du temps pour les plantes ANS; b: nombre de fleurs au cours du temps pour les plantes TCP. Le nombre de fleurs totales est représenté en vert, les fleurs ANSs+ sont en rose et les fleurs avec phénotype sont en bleu.

Entre les deux figures j'ai mis, pour rappel, l'échelle de temps pendant laquelle j'ai fait les notations. La distance entre 2 traits noirs verticaux représente une semaine.

Les cellules des sépales des « fleurs ANSs+ » observées au MEB sont bombées (figure 19f) tandis que les cellules des pétales sont plus plates (figure 19n). Ces types de cellules correspondent à ce qui a été observé chez les plantes témoins (figures 19 e et m).

Lorsque les fleurs avec phénotype (qu'elles soient issues de plantes ANS ou TCP) présentent une anomalie à l'extrémité d'un sépale on peut voir que le type cellulaire a changé à cet endroit précis. En effet, on trouve bien les cellules de types sépales dans la partie normale du sépale (figures 19g et h) mais ce sont des cellules de types pétales que l'on trouve au niveau de l'extrémité anormale (figures 19k et l).

Lorsque la fleur avec phénotype a un sépale « pétaloïde » (ressemblant fortement à un pétale) on trouve là encore les deux types cellulaires (figures 19o et p).

I.4.2. Description temporelle

De la première infiltration à la fin des notations se sont écoulés 95 jours dont 36 jours d'infiltration.

Les premières fleurs ANSs+ sont apparues en même temps que les fleurs avec phénotype au bout de 25 jours après la première infiltration (figure 21). Les premières fleurs ANSs+ ont été notées sur les plantes ANS et TCP tandis que les premières fleurs avec phénotype sont apparues uniquement sur les plantes TCP (figures 21). Pendant le mois suivant (jusqu'au 26 Avril), des fleurs ANSs+ ont été continuellement observées sur les deux types de plantes (figures 22 a et b). Durant cette période, la proportion de fleurs ANSs+ sur les plantes ANS est 1,5 fois plus élevée que celle observée sur les plantes TCP.

On peut définir un pic de floraison qui a commencé 53 jours après le début des infiltrations (le 26 avril). En effet, le nombre total moyen de fleurs par jour et par plante est passé de 0,3 à 1 pour les plantes ANS et TCP.

C'est pendant ce pic de floraison que des fleurs avec phénotype ont commencé à être visible sur des plantes ANS (figure 22a). Le nombre de fleurs avec phénotype sur les plantes TCP a également augmenté pendant cette période. Dans la suite de ce rapport, je décrirais les fleurs des plantes ANS en même temps que celles des plantes TCP puisque les plantes ANS ont donné les mêmes types de fleurs.

Au bout de 71 jours après la première infiltration (le 14 Mai), j'ai arrêté de faire des notations sur toutes les fleurs pour me concentrer uniquement sur les fleurs ANSs+ et les fleurs avec phénotype. Nous avons pris cette décision parce qu'il y avait trop de notations à faire chaque jour sur l'ensemble des fleurs arrivées à maturité. De plus, un grand nombre de notations

Tableau III: Comparaisons de moyennes du nombre d'organes chez les fleurs des plantes infiltrées « + feuilles » et « - feuilles ».

	Plantes -feuilles moyenne (e.t.) (708 fleurs)	Plantes +feuilles moyenne (e.t.) (594 fleurs)	Test de Student (Pvalue)
Sépales	4,94 +/- 0,33	4,96 +/- 0,21	0,2971
Pétales	4,96 +/- 0,31	4,95 +/- 0,22	0,6687
Etamines	59,17 +/- 6,18	58,42 +/- 6,41	0,0922
Carpelles	5,21 +/- 0,79	5,28 +/- 0,81	0,1971

Tableau IV: Comparaison de fréquences des fleurs ANSs+ chez les plantes infiltrées « + feuilles » et « - feuilles ». La valeur significative du test de Student est notée en jaune.

	nombre de fleurs ANSs+	nombre de fleurs ANSs-	fréquence ANSs+	Test de Chi2 (Pvalue)
+feuilles	117	278	0,30	0,0185
-feuilles	108	374	0,22	

Tableau V: Comparaison de fréquences des fleurs avec phénotype chez les plantes infiltrées « + feuilles » et « - feuilles ».

	nombre de fleurs phénotype+	nombre de fleurs phénotype-	fréquence phénotype+	Test de Chi2 (Pvalue)
+feuilles	26	370	0,07	0,9607
-feuilles	31	452	0,06	

Tableau VI: Comparaisons de moyennes du nombre de chaque organe des fleurs tampon par rapport aux fleurs TCP+ANS.

	Fleurs tampon moyenne (e.t.) (38 fleurs)	Fleurs TCP+ANS moyenne (e.t.) (318 fleurs)	Test de Student (Pvalue)
Sépales	4,91 +/- 0,29	4,95 +/- 0,28	0,4979
Pétales	4,95 +/- 0,22	4,96 +/- 0,27	0,8996
Etamines	59,90 +/- 3,2	58,81 +/- 6,35	0,1429
Carpelles	5,24 +/- 0,62	5,24 +/- 0,81	0,9816

avaient déjà été faites, nous avons donc une bonne représentativité du nombre d'organes moyen sur les fleurs de type témoin.

I.4.3. Comparaison des 2 techniques d'infiltration des plantes

Deux méthodes différentes d'infiltration des plantes ont été testées : une unique injection à la base de la plante, plantes notées « - feuilles » et une injection à la base plus des injections dans les feuilles, plantes notées « + feuilles ».

Pour voir si une méthode est plus efficace que l'autre, un test de Chi² a été effectué sur le nombre total de fleurs des plantes ANS et TCP seulement. Ce test a permis de montrer que les plantes « + feuilles » ont significativement plus de fleurs ANS⁺ que les plantes « - feuilles » (fréquences respectives à 0,30 et 0,22, Pvalue=0,0185) (tableau IV). Il semble donc que plus on injecte de virus dans la plante et plus elle montre de fleurs ANS⁺.

En revanche, la méthode d'infiltration n'a pas d'effet sur le nombre total de fleurs avec phénotypes (tableau V).

Pour voir si une méthode a un effet différent de l'autre sur le nombre d'organes, j'ai réalisé un test de comparaison de moyennes sur les nombre d'organes des fleurs de l'ensemble des plantes tampons, ANS et TCP (tableaux III). Le test de Student n'a révélé aucun effet de la méthode d'infiltration sur le nombre de sépales, pétales, étamines et carpelles.

I.4.4. Effet sur le nombre d'organes totaux

Pour tester si l'inhibition des gènes *ANS* et *TCP* a un effet sur le nombre d'organes, nous avons utilisé uniquement les données correspondant à la période où toutes les fleurs ont été notées, c'est-à-dire du 29 Mars au 14 Mai (soit 318 fleurs ANS et 577 fleurs TCP). Puisque nous avons vu un effet du tampon d'infiltration sur le nombre d'étamines, nous avons utilisé les fleurs « tampon » comme témoin pour cette analyse (soit 38 fleurs).

Lorsque l'on fait un test de Student sur le nombre d'organes des fleurs ANS par rapport aux fleurs TCP (tableau VI), le test montre que les fleurs ANS ont significativement moins de carpelles que les fleurs TCP (respectivement 5,18 et 5,24 carpelles, Pvalue=0,0069). Il n'y a pas de différence pour les autres organes. Si on compare les fleurs tampon au cumul des fleurs ANS+TCP, on obtient des différences non significatives pour le nombre de sépales, pétales et étamines (tableau VII).

Tableau VII: Comparaisons de moyennes du nombre de chaque organe des fleurs TCP par rapport aux fleurs ANS. La valeur significative du test de Student est notée en jaune.

	Fleurs TCP moyenne (e.t.) (577 fleurs)	Fleurs ANS moyenne (e.t.) (318 fleurs)	Test de Student (Pvalue)
Sépales	4,96 +/- 0,20	4,95 +/- 0,31	0,3169
Pétales	4,96 +/- 0,25	4,96 +/- 0,29	0,7011
Etamines	58,52 +/- 5,99	58,97 +/- 6,54	0,6043
Carpelles	5,24 +/- 0,93	5,18 +/- 0,72	0,0069

Tableau VIII: Comparaison de fréquences des fleurs avec phénotype entre les plantes ANS et TCP. La valeur significative du test de Student est notée en jaune.

	nombre de fleurs sans phénotype	nombre de fleurs avec phénotype	fréquence avec phénotype	Test de Chi2 (Pvalue)
TCP	520	44	0,08	0,0479
ANS	302	13	0,04	

Tableau IX: Comparaison de fréquences des fleurs ANSs+ chez les plantes ANS et TCP. La valeur significative du test de Student est notée en jaune.

	nombre de fleurs ANSs-	nombre de fleurs ANSs+	fréquence ANSs+	Test de Chi2 (Pvalue)
TCP	452	110	0,19	<10-4
ANS	200	115	0,37	

Tableau X: Comparaison de fréquences des fleurs avec phénotype chez les plantes ANSs+ et ANSs-. La valeur significative du test de Student est notée en jaune.

	nombre de fleurs sans phénotype	nombre de fleurs avec phénotype	fréquence avec phénotype	Test de Chi2 (Pvalue)
ANSs+	196	29	0,13	<10-4
ANSs-	624	28	0,04	

I.4.5. Effets sur le nombre d'organes dans les fleurs ANSs+ et/ou avec phénotype

Afin d'avoir une idée de l'efficacité du VIGS selon que l'on injecte un ou plusieurs gènes à inhiber dans la plante, j'ai comparé les fréquences des fleurs *ANSs+* et *ANSs-* au sein des plantes ANS et TCP (tableau VIII). Le test de Chi2 a montré que les plantes ANS avaient significativement plus de fleur *ANSs+* que les plantes TCP (fréquence respective 0,19 et 0,37, $Pvalue < 10^{-4}$). Sachant que le vecteur intégré dans les plantes ANS contient un fragment d'ANS de 440pb et que celui qui est intégré dans les plantes TCP fait en tout 986pb, on peut déduire du test de Chi2 qu'une petite insertion dans TRV2 donne une meilleure efficacité de l'inhibition.

Devant la présence inattendue de fleurs avec phénotype chez les plantes ANS, j'ai voulu tester si le nombre d'organes avec phénotype était le même dans les types de plantes (ANS ou TCP). Pour cette analyse, je n'ai utilisé que les fleurs ayant donné un phénotype sur les sépales (tableau IX). J'ai réalisé un test de Chi2 qui a montré que les fleurs des plantes TCP ont significativement plus de sépales modifiés que les fleurs des plantes ANS (fréquence respective 0,08 et 0,04, $Pvalue = 0,0479$). Cela indique que ce qui déclenche le phénotype est présent en plus grande quantité dans les plantes TCP.

J'ai ensuite voulu voir s'il y avait une corrélation entre le fait qu'une fleur soit *ANSs+* et le fait qu'elle ait un phénotype. J'ai réalisé une comparaison des fréquences des fleurs avec phénotype en fonction de leur type *ANSs+* ou *ANSs-* en cumulant les informations de toutes les fleurs des plantes ANS et TCP (tableau X). Le test de Chi2 a montré que les fleurs *ANSs+* avaient significativement plus de chance d'avoir un phénotype que les fleurs *ANSs-* (fréquence respective 0,13 et 0,04, $Pvalue < 10^{-4}$).

I.5. Effet de l'inhibition des gènes *ANS* et *TCP* sur leur niveau d'expression

Pour vérifier s'il y a bien eu diminution de l'expression des gènes *ANS* et *TCP* dans les plantes ANS et TCP, j'ai réalisé des PCR semi-quantitatives sur ADNc. J'ai utilisé le gène de l'*ACTINE* comme contrôle interne de la quantité d'ADNc présente dans chaque échantillon. Les PCR ont été faites sur les sépales, pétales et étamines d'une fleur d'une plante « tampon » et d'une fleur *ANSs+* d'une plante ANS ainsi que sur les sépales avec phénotype des fleurs de

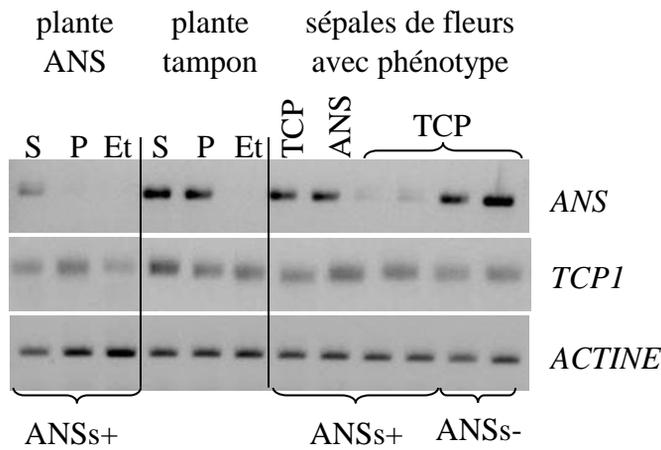


Figure 23: résultats de PCR semi-quantitatives sur les gènes *ACTINE*, *ANS* et *TCP1*. Les PCR ont été faites sur les ADNc de sépales (S), pétales (P) et étamines (Et) d'une fleur d'une plante tampon et d'une fleur ANS^{s+} d'une plante ANS et sur les sépales avec phénotype des fleurs de plantes TCP et ANS (exprimant ou non l'*ANS*). Le gène *ACTINE* sert de contrôle interne de quantité d'ADNc.

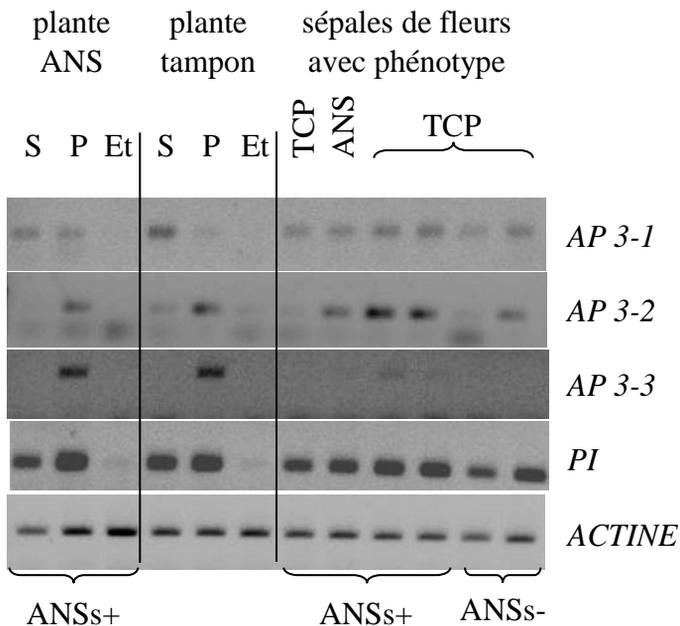


Figure 24: résultats de PCR semi-quantitatives sur les gènes de la fonction B. Les PCR ont été faites sur les ADNc de sépales (S), pétales (P) et étamines (Et) d'une fleur d'une plante tampon et d'une fleur ANS^{s+} d'une plante ANS et sur les sépales avec phénotype des fleurs de plantes TCP et ANS (exprimant ou non l'*ANS*). Le gène *ACTINE* sert de contrôle interne de quantité d'ADNc. Les 3 homologues du gène *APETALA 3* ont été testés (*AP3-1*, *AP3-2* et *AP3-3*) ainsi que le gène *PISTILLATA (PI)*.

plantes TCP et ANS (exprimant ou non l'ANS). Toutes les fleurs ont été prélevées avant anthèse.

Le gène *ANS* est fortement exprimé dans les sépales et pétales de la fleur « tampon » et dans les fleurs ANS- avec phénotype mais n'est pas (ou très peu) exprimé dans les étamines. Ce résultat est logique puisque les étamines ne sont pas colorées en rouge. Lorsque les fleurs sont ANS+ le niveau d'expression du gène *ANS* est fortement diminué dans les sépales et encore plus dans les pétales (figure 23). Cela prouve l'efficacité de l'inhibition du gène *ANS*.

L'amplification du gène *TCP1* montre une expression de ce gène dans les sépales, pétales et étamines des plantes tampon, ANS et TCP. Il ne semble pas exister de différence d'expression entre ces 3 types de plantes.

Le gène *TCP2* n'a pas donné de résultat visible sur gel d'agarose pour aucun des échantillons testés.

I.6. Expression des gènes de la fonction B dans les plantes modifiées

Devant les types de phénotypes que nous avons observés, nous avons supposé que l'inhibition des gènes *TCP* avait pu entraîner la modification de l'expression des gènes de la fonction B, gènes qui déterminent l'identité des pétales et des étamines (Krizek, 1996 ; Krizek et Fletcher, 2005 ; Theissen et *al.*, 2000). Il y a 2 gènes qui sont responsables de la fonction B : *APETALA 3* (*AP3*) et *PISTILLATA* (*PI*). Le gène *APETALA 3* a trois homologues notés *AP3-1*, *AP3-2* et *AP3-3*. J'ai réalisé une PCR pour chacun de ces gènes sur les sépales, pétales et étamines d'une fleur d'une plante tampon et d'une fleur ANS+ d'une plante ANS ainsi que sur les sépales avec phénotype de fleurs de plantes TCP et ANS (exprimant ou non l'ANS). J'ai utilisé l'*ACTINE* comme contrôle interne de la quantité d'ADNc.

Le gène *AP3-1* s'exprime chez toutes les plantes testées et sur tous les organes hormis les étamines (figure 24). L'*AP3-2* s'exprime principalement dans les pétales des fleurs testées et plus ou moins fortement dans les sépales des fleurs témoins, ANS et sépales avec phénotype. L'*AP3-3* s'exprime uniquement dans les pétales des fleurs témoins et ANS et faiblement dans certains sépales avec phénotype. Le gène *PI* s'exprime fortement chez toutes les plantes testées et sur tous les organes sauf les étamines où il est très faiblement exprimé.

D'après les résultats sur les témoins, *AP3-3* s'exprime spécifiquement dans les pétales. Hors une expression a été aussi détectée dans les sépales avec phénotype ce qui appuie notre hypothèse de conversion homéotique des sépales en pétales.

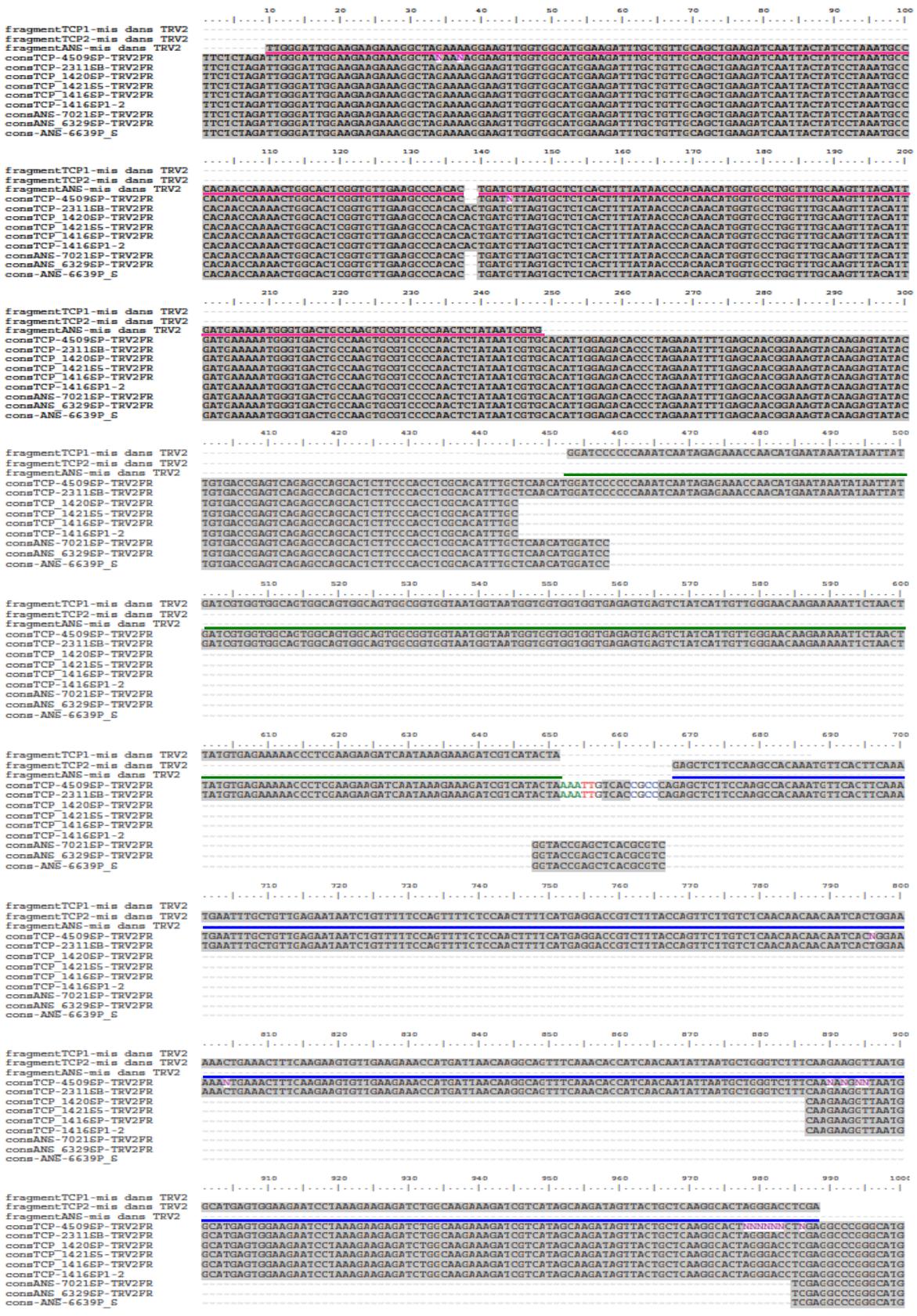


Figure 25: Alignement des séquences retrouvées dans les fleurs après infiltration. En rose on retrouve le gène *ANS*, en vert le gène *TCPI* et en bleu le gène *TCP2*. Les polymorphismes sont visualisées par des lettres en couleur sur fond blanc.

I.7. Test de l'hypothèse d'une contamination des plantes ANS

Devant le nombre de plantes ANS qui ont présenté des fleurs avec phénotype (9 plantes sur 19), nous nous sommes interrogés sur les raisons qui ont pu conduire à ce résultat. La première idée à laquelle nous avons pensé fut que le phénotype observé ne devait pas être spécifiquement dû à l'inhibition de nos gènes *TCPI* et *TCP2*. En faisant des recherches dans la bibliographie, nous n'avons pas trouvé d'information concernant ce type de phénotype qui serait apparu lors d'autres expériences de *VIGS* sur Ancolies (Gould et Kramer, 2007). Nous avons donc pensé que des plantes ANS avaient pu être contaminées avec le plasmide TRV2-*ANS-TCPI-TCP2* puisque le virus TRV se transmet par contact.

Pour rechercher cette éventuelle contamination, j'ai réalisé des PCR pour amplifier les plasmides TRV2 injectés dans les plantes. J'ai utilisé les mêmes amorces que lors de la vérification des constructions : les amorces TRV2-1 et TRV2-2 qui sont spécifiques au plasmide TRV2. J'ai obtenu des amplifications pour seulement 8 fleurs : 3 fleurs de 3 plantes ANS différentes et 5 fleurs de 3 plantes TCP différentes (3 fleurs d'une même plante ont été testées). Les séquences obtenues pour les fleurs des plantes ANS correspondent parfaitement au fragment du gène *ANS* du plasmide TRV2-*ANS*. Pour les plantes TCP, on retrouve la séquence complète du plasmide TRV2-*ANS-TCPI-TCP2* pour 2 des fleurs mais, en revanche, les 3 autres fleurs, issues de la même plante TCP, donnent une séquence incomplète. En effet, le fragment du gène *TCPI* à été totalement tronqué et seules les 100 dernières paires de bases du *TCP2* restent (figure 25).

II. Extension méthodologique de la technique du *VIGS*

II.1. Application à d'autres Renonculacées

Dans la famille des Renonculacées, la technique du *VIGS* n'a été mise au point que chez l'ancolie. Pour pouvoir étendre nos connaissances sur le rôle des gènes *TCP* au sein de cette famille, nous avons testé la technique du *VIGS* sur d'autres membres. Nous avons choisi une autre espèce actinomorphe : *Nigella damascena* et une espèce zygomorphe : *Consolida regalis*.

Lors de cette expérimentation nous n'avons pas eu assez de plantes de *C. regalis* viables, nous n'avons donc pas pu tester le *VIGS* sur cette espèce.

Tableau XI: Résultats de l'extension méthodologique du VIGS.

a: Test de l'application du VIGS sur *N. damascena*

b: Test des limites du VIGS sur *A. Alpina*

Dans chaque tableau on retrouve le nombre de plantes semées au départ pour chaque type de construction testé, le nombre de plantes ayant survécues, le pourcentage de ces survivants et le pourcentage de phénotype visible (PDSs+) sur ces plantes survivantes.

a

<i>N. damascena</i>	Semis	Survivants	% de survivants	phénotypes	% phénotypes
déterrées-rempotées	12	12	100	0	0
infiltrées avec le tampon	12	11	92	0	0
TRV2	30	25	83	0	0
PDS-Nd	30	13	43	9	69

b

<i>A. Alpina</i>	Semis	Survivants	% de survivants	Phénotypes	% phénotypes
TCP1-2-TRV2-ANS	30	18	60	0	0
PDS-Aq	33	19	58	8	42
PDS-Nd	33	17	51	13	76
PDS-Cr	33	11	33	3	27

II.1.1. Constructions et infiltrations

J'ai utilisé le gène *PDS* pour voir si la technique du *VIGS* était applicable chez *N. damascena*. Il est constitutif, est exprimé à un stade précoce du développement et son inhibition n'est pas létale pour la plante. Ce gène entre en jeu dans la synthèse des caroténoïdes qui collectent la lumière nécessaire pour la photosynthèse tout en protégeant la chlorophylle grâce à leur action photoprotectrice. Si on inhibe l'expression de ce gène on obtient un blanchiment des feuilles ce qui fait du gène *PDS* un outil idéal pour une visualisation facile et rapide de l'effet du *VIGS*.

J'ai utilisé 12 plantes témoins seulement déterrées puis repotées. J'ai infiltré, une seule fois, les plantules sous vide, 33 jours après le semis, avec soit le tampon d'infiltration seul (12 plantes tampon), soit le plasmide TRV2 sans insert (30 plantes TRV2), soit le plasmide TRV2 auquel j'ai intégré le fragment du gène *PDS* de *N. damascena* (30 plantes TRV2-*PDS*-*Nd*).

II.1.2. Description des phénotypes observés

II.1.2.1. *Plantes témoins et plantes tampons*

Lors de la notation 35 jours après l'infiltration, aucune des 12 plantes témoins n'était morte après avoir été déterrée et repotée et une seule des 12 plantes tampons était morte après avoir été déterrée, infiltrée sous vide et repotée.

Les plantes des deux types se sont développées normalement jusqu'à atteindre environ 25 cm de haut, leur feuillage était dense avec des feuilles bien vertes, fines et découpées (figure 26a). L'infiltration n'a donc pas d'effet visible sur le développement des plantes.

II.1.2.2. *Plantes infiltrées avec le plasmide TRV2 sans insert*

Sur les 30 plantes infiltrées par le plasmide TRV2 sans insert seules 25 ont survécu (tableau XIa).

Les plantes TRV2 avaient atteint 15 cm de haut au moment de la notation et elles n'avaient que 3 ou 4 feuilles bien vertes, fines et découpées (figure 26b).

Le virus TRV semble donc gêner le développement normal des plantes.

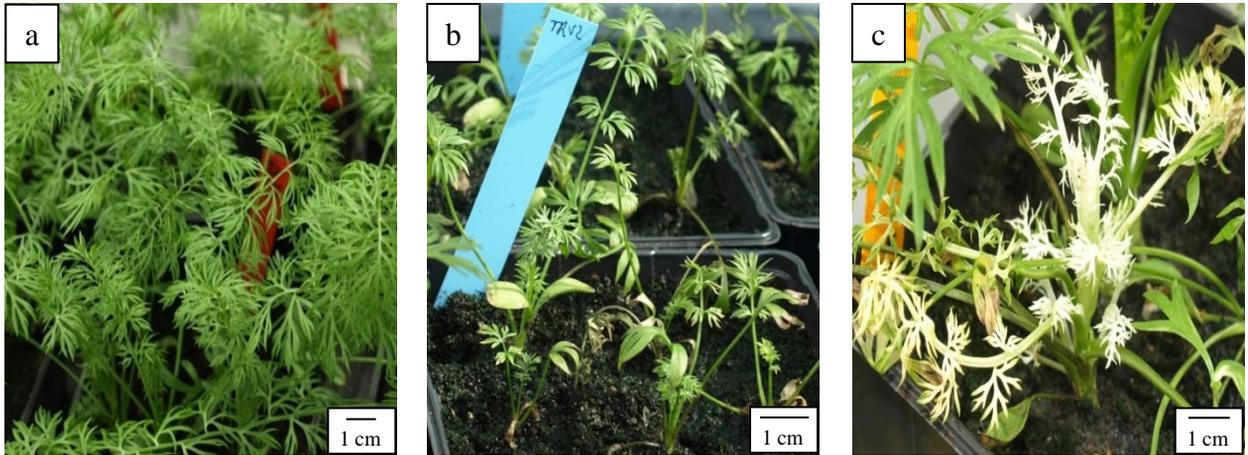


Figure 26: Effet du VIGS sur *N. damascena* 35 jours après infiltration.

a: Nigelles déterrées et repotées (les plantes infiltrées avec le tampon d'infiltration seul avaient le même aspect).

b: Nigelles infectées avec le virus TRV2

c: Nigelles infectées avec le virus TRV2-*PDS* avec effet de l'inhibition du gène *PDS* visible

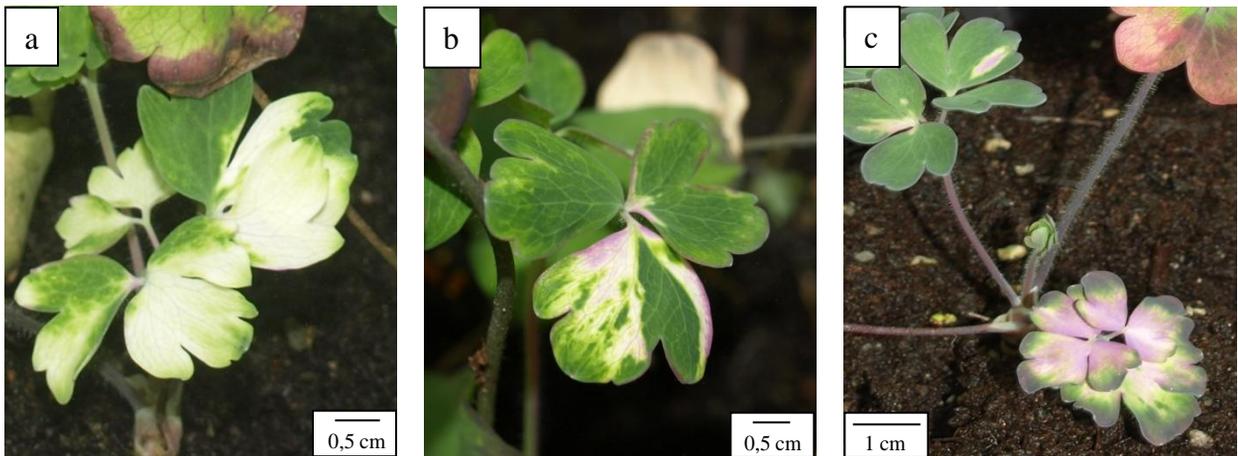


Figure 27 : Visualisation de l'effet de l'inhibition d'homologues du gène *PDS* sur des feuilles d'*A. alpina* 35 jours après infiltration.

a : gène *PDS* provenant d'*A. vulgaris*

b : gène *PDS* provenant de *N. damascena*

c : gène *PDS* provenant de *C. regalis*

II.1.2.3. *Plantes infiltrées avec le plasmide TRV2-PDS-Nd*

Sur les 30 plantes infiltrées par le plasmide TRV2-*PDS-Nd* seules 13 ont survécu (tableau XIa).

La première observation de feuilles blanches, signe de l'inhibition du gène *PDS* (*PDSs+*), a été notée 17 jours après l'infiltration et 35 jours après l'infiltration j'ai noté que cela était visible sur 69 % des plantes qui ont survécus (tableau XI).

Les plantes *PDSs+* ne mesuraient que 3 à 8 cm de haut au moment de la notation contre 15cm en moyenne pour les plantes ne présentant pas d'inhibition visible du gène *PDS*. Au sein d'une même plante on pouvait voir une différence de taille entre les feuilles poussées avant l'infiltration puisqu'elles avaient la même taille que les feuilles témoins et les feuilles poussées après l'infiltration et ayant le gène *PDS* inhibé puisqu'elles étaient plus petites (figure 26c).

Le plasmide TRV2-*PDS* a un effet sur le développement des plantes qui est plus fort que celui obtenu avec le virus TRV seul.

II.1.3. Effet de l'inhibition du gène *PDS* sur son expression

Afin de comparer le niveau d'expression du gène *PDS* des nigelles ayant été infiltrées avec le plasmide TRV2-*PDS-Nd* par rapport à celui des autres plantes, j'ai extrait les ARN totaux des différents types de plantes, j'ai produit des ADNc par transcription inverse et réalisé des PCR semi-quantitative sur ces ADNc. J'ai essayé d'uniformiser la quantité d'ADNc pour chaque type de plante grâce au gène de *l'ACTINE* puis j'ai testé 2 couples d'amorces pour voir l'expression du gène *PDS*. Un seul des couples d'amorces a donné une amplification (figure 28a). Le niveau d'expression du gène *PDS* des plantes PDS est inexistant ou trop faible pour être visualisé sur gel d'agarose tandis que les plantes témoins, tampons et TRV2 ont un niveau d'expression à peu près semblable (si on compare avec *l'ACTINE* qui sert de contrôle interne de quantité d'ADNc). Il y a donc bien eu une inhibition de l'expression du gène *PDS* dans les plantes PDS.

II.2. Limites du VIGS

J'ai testé l'impact du degré d'identité entre séquences hétérologues sur l'effet du VIGS chez *A. alpina*. En effet, il peut être plus facile et plus rapide de faire du VIGS en utilisant la séquence d'un gène déjà connu chez une espèce de la même famille plutôt que de devoir

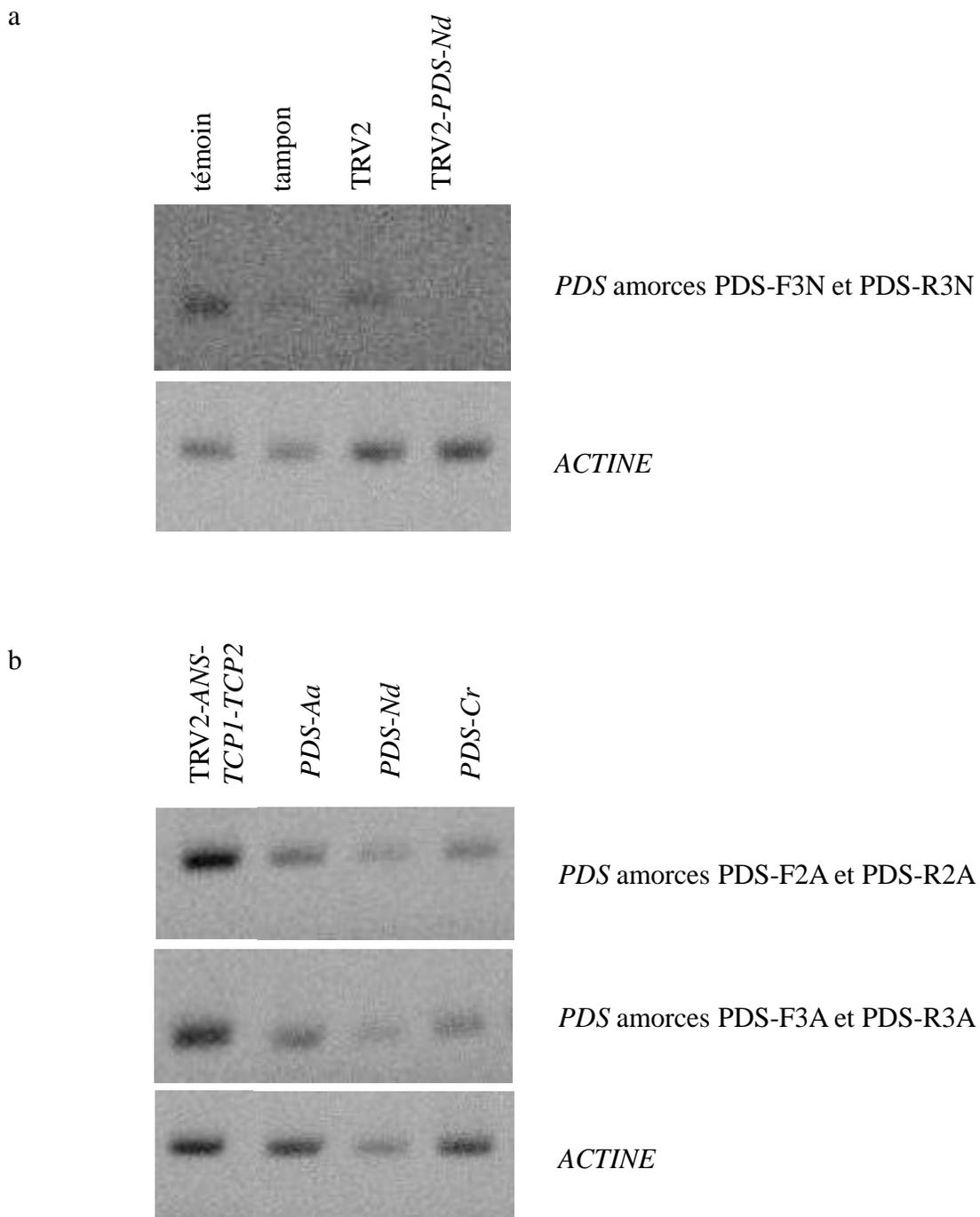


Figure 28: résultats de PCR semi-quantitatives sur les gènes *PDS*
 Les PCR ont été faites sur les ADNc de feuilles. Le gène *ACTINE* sert de contrôle interne de quantité d'ADNc. Différents couples d'amorces d'amplification du gène *PDS* ont été testé chez: a- *N. damascena*, b- *A. alpina*.

caractériser ce même gène pour l'espèce qui nous intéresse. Pour faire ce test, j'ai utilisé des fragments du gène *PDS* d'*A. vulgaris* (fourni par E. Kramer), de *N. damascena* et de *C. regalis*.

II.2.1. Constructions et transformations

Après avoir caractérisé le gène *PDS* de *N. damascena* et de *C. regalis*, 2 espèces différentes de Renonculacée, j'ai comparé les séquences obtenues en utilisant le bast 2 à 2 du site NCBI. Les séquences des gènes *PDS* d'*A. vulgaris* et d'*A. alpina* ont 89% d'identité (la séquence d'*A. alpina* à été fournie par P.Laufs de l'INRA de Versailles). Les séquences issues de *N. damascena* ou de *C. regalis* ont toutes les deux 90% d'identité avec celle d'*A. vulgaris* et 87% d'identité avec *A. alpina*.

J'ai infiltré sous vide, une seule fois, les plantules 43 jours après le semis. J'ai utilisé 30 plantes que j'ai infiltrées avec la construction TRV2-ANS-TCP1-TCP2 pour voir si l'inhibition des gènes TCP avait un effet au stade végétatif (aucun effet n'a été observé). Ces mêmes plantes ont été utilisées comme si elles avaient juste été infiltrées avec le plasmide TRV2 puisqu'elles ne contenaient pas le gène PDS qui nous intéresse dans cette expérience. 33 plantules d'*A. alpina* ont été infiltrées avec chacune des constructions TRV2-PDS-Av (*A. vulgaris*), TRV2-PDS-Nd et TRV2-PDS-Cr.

II.2.2. Description des phénotypes observés

Les *A. alpina* ont subi une invasion de larves d'insectes qui ont dévorés leurs racines c'est pourquoi 30 jours après l'infiltration un repiquage des plantes à été nécessaire pour essayer d'en sauver quelques-unes. Toutes les ancolies sont restées de petites tailles et ont eu du mal à survivre suite à cette invasion c'est pourquoi aucune donnée sur le développement des plantes n'a été notée.

II.2.2.1. *Plantes infiltrées avec le plasmide TRV2-ANS-TCP1-TCP2*

Lors de la notation 35 jours après l'infiltration, il ne restait plus que 18 plantes vivantes sur les 30 plantes infiltrées avec le plasmide TRV2-ANS-TCP1-TCP2 et parmi celles-ci aucune n'avait de feuilles blanches (tableau XIb). De plus, leur morphologie générale était identique à

celle des *A. alpina* des autres tests ce qui veut dire que *TCPI* et *TCP2* n'ont pas d'effet sur les feuilles. Nous nous sommes servis de ces plantes comme plantes témoins puisqu'elles n'avaient pas reçus de plasmides *TRV2-PDS*.

II.2.2.2. *Plantes infiltrées avec les plasmides TRV2-PDS*

Sur les 33 plantes infiltrées par les plasmides *TRV2-PDS-Aq*, *TRV2-PDS-Nd* et *TRV2-PDS-Cr* seules 19, 17 et 11 plantes ont respectivement survécu à l'invasion de larves (tableau XIb). La première observation de feuilles *PDSs+*, signe de l'inhibition du gène *PDS*, a été notée 27 jours après l'infiltration et 35 jours après l'infiltration j'ai noté que cela été visible sur 42 % des plantes *TRV2-PDS-Aq*, 76 % des plantes *TRV2-PDS-Nd* et 27 % des plantes *TRV2-PDS-Cr* qui ont survécu (tableau XIb et figure 27). Le *VIGS* a donc fonctionné quelle que soit la construction testée.

II.2.3. Effet de l'inhibition du gène *PDS* sur son expression

Afin de comparer le niveau d'expression du gène *PDS* des *A. Alpina* en fonction du plasmide qui leur a été infiltré, j'ai extrait les ARN totaux des différents types de plantes, j'ai produit des ADNc par transcription inverse et réalisé des PCR semi-quantitative sur ces ADNc. La quantité d'ADNc de chaque type de plante a été uniformisé au mieux grâce au gène de l'*ACTINE* puis j'ai testé 2 couples d'amorces pour voir l'expression du gène *PDS* (figure 28b).

Le niveau d'expression du gène *PDS* des plantes infiltrées par les constructions *TRV2-PDS* est plus faible que celui visible sur les plantes infiltrées avec le plasmide *TRV2-ANS-TCPI-TCP2*. Si on compare les 3 constructions *TRV2-PDS* entre elles, il semble que leur niveau d'expression soit les mêmes (comparaison faite à l'œil en tenant compte du niveau d'expression de l'*ACTINE*). L'inhibition du gène *PDS* semble avoir fonctionné aussi bien pour les 3 constructions testées.

Discussion

La méthode du *Virus Induced Gene Silencing (VIGS)* chez *Aquilegia coerulea* ‘Origami’

Lors de mes expériences de VIGS j’ai montré que le tampon d’infiltration n’a pas d’effet sur la morphologie des fleurs, ni sur le nombre de sépales, pétales ou carpelles. En revanche il entraîne une augmentation du nombre total d’étamines (de 59,59 à 64 étamines). Bien que ce résultat indique un effet du tampon d’infiltration qui peut potentiellement modifier la compréhension des résultats de certaines études, cela n’interfère pas avec nos résultats. En effet, les constructions ANS et TCP n’ont pas d’effet sur le nombre d’organes, ce n’est donc pas un élément qui permettra de déduire le rôle de nos gènes d’intérêt.

Le test sur la méthode d’infiltration (« + feuilles », « - feuilles ») n’a pas montré d’effet sur le nombre total d’organes mais il y a significativement plus de fleurs ANSs+ (blanches) chez les plantes « + feuilles » (pour lesquelles on a injecté des agrobactéries dans les feuilles en plus de la base de la plante) que chez les plantes « - feuilles » (pour lesquelles seule l’injection à la base de la plante a été faite) (fréquences respectives de 0,3 et 0,22). Cet effet peut être expliqué par le fait que l’injection dans la base des plantes est délicate à réaliser, le tampon d’infiltration ne pénètre pas toujours correctement dans les plantes, entraînant ainsi une perte d’une partie des agrobactéries. Chez les plantes « +feuilles » le nombre d’agrobactéries injectées est plus important, le nombre de virus produits dans la plante après injection l’est donc aussi. La plante va produire plus de ARNi pour lutter contre ces virus permettant ainsi l’inhibition de l’expression du gène cible dans plus de fleurs. En revanche, le nombre de fleurs avec phénotype n’est pas influencé par la méthode d’infiltration.

Les fleurs ANSs+ (fleurs blanches) sont plus fréquentes chez les plantes ANS (0,37) que chez les plantes TCP (0,19) ce qui laisse supposer que les constructions contenant des petits fragments sont plus efficaces pour induire le VIGS. En effet, le fragment ANS inséré dans le vecteur TRV2 fait 440pb contre 986pb pour le fragment ANS-TCP1-TCP2. L’influence de la taille des inserts sur l’efficacité du VIGS semble surtout dépendre du vecteur utilisé et semble être assez variable d’une espèce à une autre. Bruun-Rasmussen et ses collaborateurs (2007) ont montré que, chez l’orge et avec le vecteur issu du virus de la mosaïque de raie d’orge (BSMV), le VIGS donne de meilleurs résultats lorsque l’insert a une taille comprise entre 128 et 584 pb. Toutefois, en utilisant le vecteur TRV chez *Nicotiana benthamiana*, Liu et Page

(2008) ont, eux, montré que des inserts inférieurs à 1500pb donnent de bons résultats. Lorsque les fragments ont plus de 1500pb ou s'ils ciblent les extrémités du gène à inhiber ils entraînent peu ou pas de diminution du niveau d'expression du gène ciblé. Une explication possible à ce résultat est que l'on détériore la reproduction virale quand un grand fragment étranger est inséré au génome viral limitant ainsi la diffusion du virus (Liu et Page, 2008). Une autre possibilité est que les grands inserts sont tronqués lors de la recombinaison et donc, même si le TRV se répand de manière systémique dans la plante, l'insert ayant été perdu, l'inhibition voulue ne peut pas se faire (Liu et Page, 2008).

De même, j'ai constaté qu'il y avait significativement plus de chance de voir un phénotype sur une fleur si celle-ci est *ANSs+* (0,13) que si elle est *ANSs-* (0,04). On peut supposer que lorsque le VIGS se met en place il permet l'inhibition de tous les gènes ciblés. Parfois une fleur a présenté un phénotype alors qu'elle était *ANSs-*, on suppose alors qu'une recombinaison a tronqué une partie de l'insert mais que le fragment restant (*TCP* sans *ANS*) a été suffisant pour induire une inhibition. Lorsque j'ai réalisé des amplifications pour vérifier la présence des constructions dans les sépales avec phénotype, je n'ai pas réussi à obtenir d'amplification visible sur des sépales *ANSs-*. En revanche, j'ai obtenu des amplifications sur des fleurs *ANSs+* qui ont montré que la construction présente dans les sépales avec phénotype n'était pas toujours conforme à celle que j'ai injectée dans la plante au départ. En effet, certaines fleurs des plantes *TCP* possèdent une construction dont le *TCP1* entier et une grande partie du *TCP2* ont été tronqués. Cela confirme la possibilité d'une délétion du gène *ANS* dans les fleurs *ANSs-* avec phénotype. Une autre hypothèse expliquant ce type de fleur est que les ARNi produits en réponse à l'infection par le virus et complémentaires de l'ARNm du gène *ANS* n'ont pas dégradé l'ARNm ciblé à cause d'une production trop tardive ou en trop faible quantité.

L'hypothèse de la contamination des plantes ANS :

Le fait d'avoir noté des fleurs avec phénotype sur les plantes ANS est un résultat inattendu pour lequel nous n'avons, pour l'instant, aucune explication claire.

Notre première hypothèse a été que le phénotype observé ne devait pas être spécifiquement dû à l'inhibition de nos gènes *TCP1* et *TCP2*. Nous avons supposé que cela pouvait être dû à l'infection par le virus TRV. Le témoin permettant de voir l'effet de l'infiltration des vecteurs TRV1 et TRV2 sans insert n'a pas été réalisé lors de notre expérimentation (à cause du manque de place dans le compartiment nous avons privilégié le témoin ANS qui semblait être plus important car il permettait de voir si le VIGS était efficace). Cependant, Wege et al. (2007)

et Gould et Kramer (2007) ont montré que ces vecteurs n'avaient pas d'effets sur l'architecture florale, la taille des organes ou le temps de floraison. Les phénotypes que l'on a obtenus ne sont sans doute pas causés par l'infection virale par le TRV.

Notre deuxième hypothèse était que le gène *ANS* pouvait avoir causé ces phénotypes. Toutefois, Gould et Kramer (2007) mentionnent, dans leurs travaux sur le VIGS chez *A. vulgaris*, qu'ils n'ont vu aucune anomalie florale lors de leur étude.

La fréquence d'apparition des fleurs avec phénotype est plus faible chez les plantes ANS que chez les plantes TCP ce qui laisse supposer que l'élément qui induit ce phénotype est présent en plus grande quantité chez les plantes TCP. De plus, nous avons noté que l'apparition des phénotypes sur les plantes ANS est survenue 28 jours après les premiers phénotypes sur les plantes TCP. Nous avons donc pensé que des plantes ANS avaient pu être contaminées par le plasmide TRV2-*ANS-TCP1-TCP2* des plantes TCP. L'une des hypothèses pouvant expliquer la contamination est une erreur de manipulation qui aurait conduit à un mélange des constructions ou à une inversion ponctuelle entre les constructions ANS et TCP (soit au moment de la préparation des agrobactéries soit lors de l'infiltration). Le virus TRV étant transmissible par contact nous avons aussi supposé que la contamination avait pu se faire via des insectes, par l'eau ou encore par simple contact des feuilles entre elles ou lors des manipulations des plantes. Dans le compartiment de quarantaine où les plantes étaient isolées il y avait des thrips et des mouches des étangs qui ont été apportés par un terreau non traité avant le premier semis des 'Origami'. Ces insectes sont de bons vecteurs de transmission car, même s'ils ne piquent pas forcément les plantes, ils peuvent s'être posés sur des gouttes d'agrobactéries présentes sur les feuilles des plantes infiltrées avec la méthode « + feuille » et les avoir transmises à d'autres plantes. L'eau peut aussi avoir permis la contamination car l'arrosage a pu laver l'excédent de bactéries après les piqûres faites à la base des plantes et les entraîner vers les racines des plantes voisines. En effet, les pots des plantes étaient posés sur un même tablar qui recueillait l'eau des différentes plantes sans aucune compartimentation. De plus, les nombreuses manipulations des pots par le serriste, pour les arrosages, ou par moi-même, pour les infiltrations et les notations, ont probablement conduit à une contamination par contacts. En effet, les plantes étant nombreuses, il était difficile d'éviter que leurs feuilles se touchent. Une contamination a donc pu se faire soit directement de feuilles à feuilles, soit par transmission via les gants si on a oublié de changer de gants après avoir touché des plantes TCP.

Toutefois, aucune fleur avec phénotype n'a été observée sur les plantes témoins ou tampon. Ces plantes étant dans la même pièce et sur les mêmes tablars que les autres, il semble étrange

qu'elles aient échappé à la contamination. Cela peut s'expliquer par leur disposition légèrement à l'écart des autres et par le fait qu'elles étaient moins nombreuses. De plus, je les ai toujours manipulées en premier aussi bien pour les notations que lors des infiltrations avec le tampon.

On peut donc supposer que s'il y a bien eu contamination, elle serait plutôt due à une erreur soit lors de la culture des agrobactéries soit lors de l'infiltration.

Les amplifications par PCR des fragments insérés dans les plantes n'ont pas permis de déterminer si une contamination a réellement eu lieu car la présence des constructions TRV2-*ANS-TCP1-TCP2* dans les fleurs avec phénotype des plantes ANS n'a pas pu être détectée tandis que les constructions TRV2-*ANS* l'ont été. Il est possible que ce soit dû à un manque de sensibilité de la méthode de visualisation des PCR. En effet, les amorces TRV2-1 et TRV2-2 utilisées permettent aussi bien l'amplification de la construction TRV2-*ANS* que celle de la construction TRV2-*ANS-TCP1-TCP2*. On suppose que la contamination est due à une erreur ponctuelle ou à des transmissions de petites quantités de bactéries par contact, on s'attend donc à ce que la majorité des constructions présentes dans la plante soient de type TRV2-*ANS*. Une PCR va permettre d'amplifier les différentes constructions présentes dans l'échantillon mais cette amplification se fait préférentiellement sur les molécules présentes en grand nombre et sur celles qui sont les plus faciles à amplifier c'est-à-dire les plus petites. Le fragment correspondant à la construction TRV2-*ANS* sera donc majoritairement amplifié et lors de la visualisation des amplifications sur gel d'agarose on ne pourra pas forcément voir les molécules qui sont minoritaires et qui correspondent à la construction TRV2-*ANS-TCP1-TCP2*.

Rôle des gènes *TCP* chez *Aquilegia coerulea* 'Origami' :

Lors de sa thèse, F. Jabbour (2009) a caractérisé des gènes homologues de *CYCLOIDEA* chez 5 espèces de Renonculacées (*A. napellus*, *D. staphisagria*, *A. alpina*, *C. recta* et *N. damascena*). Il a montré que ces gènes, qu'il a appelé *RANACYL*, s'expriment à un stade précoce du développement et ce aussi bien pour des fleurs zygomorphes qu'actinomorphes. Deux gènes *RANACYL* ont été trouvés chez *Aquilegia alpina*. J'ai caractérisé ces mêmes gènes chez *Aquilegia coerulea* 'Origami' (appelés *TCP1* et *TCP2*).

Les expériences de VIGS que j'ai réalisées sur ces gènes *TCP1* et *TCP2* chez 'Origami' ont permis de mettre en évidence deux types de phénotypes induits par l'inhibition de l'expression de ces gènes. J'ai observé le plus souvent une transformation morphologique

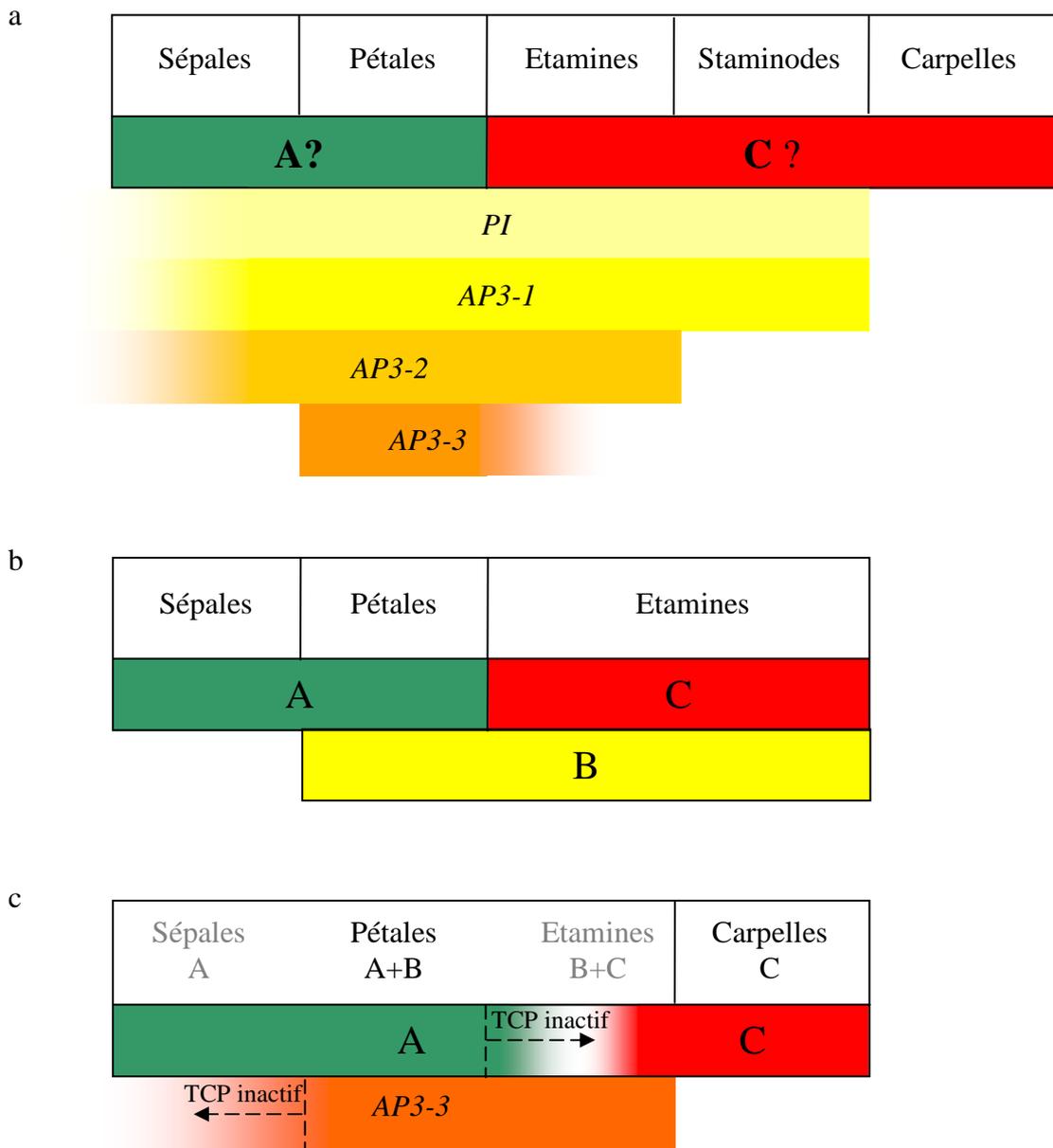


Figure 29: Variantes possibles du modèle ABC

a: Représentation schématique du modèle ABC de développement floral chez l'ancolie. La fonction A permet de faire les sépales, les gènes des fonctions A et B (*APETALA3* (*AP3-1*, *AP3-2*, *AP3-3*) et *PISTILLATA*) font les pétales, la fonction C permet la formation des étamines.

b: Représentation schématique du modèle de développement floral ABC dans le cas d'un mutant *SUPERMAN* (*SUP*).

c: Représentation schématique du modèle supposé de développement floral ABC en cas d'inhibition des gènes *TCP1* et *TCP2* chez 'Origami'.

partielle des sépales en pétales et parfois des étamines en structures pétaloïdes, mais les carpelles n'ont jamais été touchés. Ces modifications ont été confirmées par des observations au microscope électronique à balayage (MEB) qui ont montré la présence de cellules de type pétales sur des organes qui par ailleurs avaient des cellules de type sépales ou étamines. L'inhibition des gènes *TCP* a donc conduit à une conversion des sépales et des étamines en pétales.

Selon le modèle ABC d'*A. thaliana*, on sait que pour produire des pétales, il est nécessaire d'avoir une expression des gènes de la fonction A (*APETALA 1* et 2) et des gènes de la fonction B (*APETALA 3 (AP3)* et *PISTILLATA (PI)*). Chez l'ancolie le modèle ABC est modifié (figure 29a) (Kramer et al., 2007). En effet, les 3 gènes homologues d'*AP3* (*AP3-1*, *AP3-2* et *AP3-3*) et le gène homologue de *PI* s'expriment dans les pétales, étamines et jusque dans les sépales. Cette expression dans les sépales est passagère, très faible et varie au cours du développement de la fleur. De plus, on ne sait pas encore si les fonctions A et C existent de la même manière que chez *A. thaliana*. En effet, Davies B. et al. (2006) ont soutenu que la fonction A, comme spécifié dans le modèle ABC classique, n'est pas applicable à *Antirrhinum* et à la grande majorité des plantes à fleurs. Le modèle de détermination des organes floraux chez *Antirrhinum* implique seulement les gènes de la fonction B et C. Bien que les homologues du gène *AP2* de la fonction A soit apparemment exprimés chez quelques angiospermes basaux (par exemple *Amborella*), l'expression des homologues d'*API* chez le nénuphar et le *Magnolia* est plus forte dans les feuilles et les carpelles que dans le périanthe. Ces gènes ne semblent donc pas jouer un rôle dans la détermination des organes liés à la fonction A. Cependant, la fonction A peut aussi être conférée par d'autres gènes que des homologues des gènes d'*A. thaliana* mais cela n'a pas été démontré pour l'instant.

Dans notre expérience, nous avons vu que le gène *AP3-3* est exprimé uniquement chez les pétales des témoins et chez les sépales convertis en pétales ce qui confirme bien qu'il y a eu une conversion homéotique des sépales en pétales (les tests sur les étamines n'ont pas donné de résultats visibles en PCR semi-quantitative sans doute à cause de la trop faible quantité d'ARN présent dans les échantillons).

L'un des rôles possibles des gènes *TCP1* et *TCP2* chez l'ancolie pourrait être de limiter l'extension de l'expression des gènes de la fonction A et B puisque ce sont ces gènes qui permettent la formation des pétales. On ne connaît pas précisément le(s) mécanisme(s) qui limite(nt) l'action de ces gènes mais des études ont montré qu'il existe des gènes cadastraux qui limitent l'action d'autres gènes dans des régions spécifiques de l'organisme (Yun, 2002).

Chez les fleurs, ces gènes permettent le maintien d'une frontière entre les différents verticilles. Un exemple d'un gène « frontière » est *SUPERMAN* (*SUP*) trouvé chez *Arabidopsis thaliana* entre le 3^{ème} et le 4^{ème} verticille. Les fleurs pour lesquelles *SUPERMAN* est inactif ont des étamines dans le verticille 4 c'est-à-dire à la place des carpelles (Schultz et al., 1991; Sakai et al., 1995). Dans ces fleurs de mutant, l'expression des gènes *AP3* et *PI* de la fonction B est non seulement détectée dans les deuxième et troisième verticilles comme attendu, mais s'étend aussi dans le quatrième verticille, menant à la formation d'étamines supplémentaires au sein du verticille des carpelles (figure 29b). Les carpelles ne se développent pas ou sont défectueux (Schultz et al., 1991; Sakai et al., 1995). La fonction principale de *SUP* est de maintenir la frontière entre les verticilles des étamines et des carpelles, en réglementant l'équilibre de la prolifération cellulaire dans ces deux verticilles. Les fonctions de *SUP* sont conservées chez d'autres plantes, comme l'illustre le cas de l'orthologue de *SUP* qui a été trouvé chez le pétunia (*PhSUP1*) (Nakagawa et al., 2004). Les plantes pour lesquelles le gène *PhSUP1* est absent, présentent une augmentation du nombre d'étamines et des carpelles et des ovules anormaux.

Dans notre expérience, nous avons choisi d'inhiber les deux gènes *TCP* en même temps mais on peut supposer que chacun d'eux à un rôle particulier. En effet, lors de l'amplification des constructions présentes dans les sépales avec phénotypes, j'ai parfois obtenu une séquence partielle de ma construction *TRV2-ANS-TCP1-TCP2* où seul l'*ANS* et 100pb de *TCP2* étaient présents. Cette délétion n'a toutefois pas empêché la visualisation d'une conversion des sépales en pétales sur les fleurs testées, bien que *TCP1* n'ait donc pas pu y être inhibé. *TCP2* semble avoir, à lui seul, entraîné cette modification. On peut alors s'interroger sur l'action que *TCP1* peut avoir. Par exemple, on peut supposer que le gène *TCP2* a un rôle de « frontière », limiteur de l'extension des gènes de la fonction B et plus particulièrement du gène *AP3-3*. Son inhibition entraînerait alors une conversion des sépales en pétales (comme on l'a vu précédemment). *TCP1*, quand à lui, peut être un régulateur des gènes des fonctions A et/ou C. En effet, il est connu que les produits des gènes A et C s'inhibent mutuellement. Si l'un des gènes *TCP* a pour effet d'inhiber l'expression du gène de la fonction A dans le verticille des étamines son absence va entraîner une extension de la zone d'action des gènes de la fonction A et donc la conversion des étamines en pétales (le résultat sera le même si le rôle du *TCP* est d'activer les gènes de la fonction C dans le verticille des étamines). Cette seconde hypothèse de deux rôles distincts pour chacun des *TCP* semble être appuyée par les résultats des tests sur le niveau d'expression de ces gènes. En effet, le gène *TCP1* ne présente pas de variation visible de son niveau d'expression dans les sépales avec phénotype par rapport aux sépales

des fleurs tampons. Cela semble indiquer qu'il n'a pas été inhibé dans ces échantillons et que, donc, il n'est pas responsable du phénotype. D'après les résultats de F. Jabbour (2009), l'expression du gène *RANACYL2* a un niveau très faible dans les fleurs épanouies, cela peut expliquer pourquoi je n'ai pas réussi à détecter l'expression du gène *TCP2* chez les fleurs d' 'Origami'. Pour savoir si les 2 *TCP* ont le même rôle ou non il faudrait réaliser des expériences de VIGS avec chacun des gènes *TCP* séparément. Des hybridations *in situ* sur des dissections de jeunes boutons floraux de plantes sauvages permettraient de voir avec précision où ces gènes sont exprimés et à quel stade (ces expériences auraient du être réalisées lors de ce stage mais elles n'ont pas pu l'être par manque de temps). On pourrait ensuite comparer ces données avec les mêmes analyses faites sur des plantes dont les gènes *TCP* ont été inhibés et ainsi en déduire le rôle de ces gènes.

Connaitre le rôle des gènes *TCP* chez une espèce actinomorphe comme l'ancolie n'est qu'une étape qui devrait conduire à la compréhension de la mise en place de la symétrie bilatérale.

Applications de la méthode du VIGS à d'autres Renonculacées :

Si les résultats obtenus sur les gènes *TCP* permettent d'émettre des hypothèses sur leur rôle chez les ancolies, il reste encore à étendre ces connaissances à d'autres membres de la famille des Renonculacées. Pour cela, j'ai voulu tester la faisabilité du VIGS chez deux autres espèces, l'une actinomorphe : *Nigella damascena* et l'autre zygomorphe : *Consolida regalis*. Nous n'avons malheureusement pas pu tester le VIGS sur *C. regalis* à cause d'un manque de plantes viables mais le test sur *N. damascena* a été concluant. En effet, bien que le développement des nigelles soit ralenti par l'infiltration avec le vecteur TRV2 sans insert, les plantes se sont quand même bien développées. On peut donc utiliser ce vecteur pour faire du VIGS sur cette espèce à condition que ce ne soit pas pour l'étude de gènes impliqués dans la croissance de la plante. De plus, 69% des plantes ont présenté des feuilles blanches, signe de l'inhibition du gène *PDS*. Ce résultat a été confirmé par le niveau d'expression du gène qui n'a pas pu être détecté sur gel d'agarose. Toutefois, l'inhibition de ce gène a eu un effet considérable sur le développement des plantes car il a conduit à une forte réduction de leur croissance. Cela peut s'expliquer par le fait que *PDS* semble s'exprimer dans les feuilles et dans la rosette des plants de nigelle tandis que chez l'ancolie il s'exprime uniquement dans les folioles. De plus, *PDS* est nécessaire pour la synthèse des β -carotènes qui sont importants

pour la photosynthèse, elle-même nécessaire au développement de la plante. L'inhibition de *PDS* à donc logiquement conduit à une difficulté de croissance.

Pour pouvoir utiliser la technique du *VIGS* sur les nigelles pour l'étude de phénotypes floraux il faudra soit utiliser un autre gène que le gène *PDS* comme témoin de l'efficacité du *VIGS* (comme le gène *ANS* par exemple), soit infiltrer les plantes par piqûre à leur base (comme nous l'avons fait pour les ancolies).

Test de l'importance de l'identité de séquences sur l'efficacité du *VIGS* chez *A. alpina*

Lorsque j'ai testé l'impact du degré d'identité de séquences hétérologues du gène *PDS* sur l'effet du *VIGS* chez *A. alpina*, j'ai obtenu le blanchiment des feuilles attendu pour toutes les constructions testées. Les séquences utilisées sont issues de plantes du même genre (séquence d'*A. vulgaris*) ou de la même famille : les Renonculacées (*N. damascena* et *C. regalis*). Elles ont respectivement 89% et 87% d'identité avec la séquence du gène *PDS* d'*A. alpina*. La diminution du niveau d'expression du gène *PDS* est la même pour toutes les constructions testées ce qui indique que le *VIGS* fonctionne correctement même avec un insert qui n'est pas identique au gène que l'on veut inhiber. De plus, ce test montre que l'on peut utiliser la séquence d'un gène déjà connu chez une espèce de la même famille pour faire du *VIGS* plutôt que de caractériser ce même gène chez l'espèce qui nous intéresse. Il faut toutefois noter que ce résultat ne s'applique que pour des fragments de gènes qui sont dans des zones conservées. En effet, il est généralement accepté qu'il faut un minimum de 85 % d'identité pour permettre le déclenchement du mécanisme d'inhibition (Benedito et al., 2004 ; Kumar et al., 2007).

Conclusion

Les gènes *TCP* que nous avons étudiés sont des homologues des gènes *CYCLOIDEA* connus pour jouer un rôle dans l'asymétrie des fleurs chez *Antirrhinum majus*.

Au début de notre étude, nous savions que ces gènes *TCP* étaient exprimés aussi bien chez les espèces zygomorphes que chez les espèces actinomorphes, nous avons donc supposé qu'ils joueraient aussi un rôle dans la morphologie de ces fleurs actinomorphes.

L'utilisation du VIGS a permis de visualiser l'effet provoqué par la diminution d'expression des gènes homologues *TCP1* et *TCP2* sur une plante actinomorphe, *A. coerulea* 'Origami'. Contrairement à ce qu'on supposait, l'inhibition de l'expression de ces gènes n'a pas modifiée la symétrie florale mais elle a entraîné des conversions homéotiques.

A partir de ces observations on a déduit que les deux homologues pouvaient avoir des rôles différents l'un comme régulateur des gènes des fonctions A ou C et l'autre comme « gène frontière » pour limiter la zone d'action des gènes de la fonction B.

Une nouvelle expérience de VIGS sur *A. coerulea* 'Origami' est en cours de réalisation. Elle permettra de vérifier les résultats obtenus dans la présente étude afin de confirmer que les phénotypes observés sur les plantes ANS étaient bien dû à une contamination. L'effet de l'inhibition des gènes *TCP1* et *TCP2* séparément sera aussi étudié afin de voir s'ils ont effectivement des rôles différents.

Pour une meilleure caractérisation fonctionnelle des gènes *TCP*, des hybridations in situ vont être faites pour vérifier la corrélation possible entre le lieu d'expression des gènes *RANACYL* et la morphologie des fleurs aux différentes étapes de leur développement.

Maintenant que nous savons que le VIGS avec le vecteur TRV fonctionne sur les plantules de *N. damascena*, un test sur plantes adultes devrait être réalisé prochainement afin de s'assurer que les tiges sont assez résistantes pour recevoir des infiltrations par piqûres. En parallèle, le test sur l'espèce zygomorphe *C. regalis* devrait être refait afin de réaliser par la suite la même étude fonctionnelle des gènes *TCP* que celle faite sur 'Origami'. Tout ces travaux devraient permettre de définir le rôle de ces gènes au sein des espèces à fleurs actinomorphes et zygomorphes chez les Renonculacées.

Annexes

Annexe 1 : Conditions de culture des ancolies en chambre de vernalisation

 INRA Institut national de la recherche agronomique Centre de VERSAILLES	FICHE DE PROGRAMMATION CLIMATIQUE PLATE-FORME NSB3	
Date de dernière mise à jour : 04/01/2010		

Plate-forme NSB3		Numéro de la salle : 09		
CLIMAT TYPE : Vernalisation Ancolies				
Date de programmation du climat type : 04/01/2010			A la demande de : Céline RIDEL	
CONDITIONS CLIMATIQUES :				
Période	Aube	Jour	Crépuscule	Nuit
Heure de début	6h 00	7 h 00	21 h 00	22 h 00
Température °C	7	10	7	5
Hygrométrie % Hr	60	60	60	60
Temps de lissage : En minute		60 min		
CONDITIONS D'ECLAIRAGE :				
Période	Aube	Jour	Crépuscule	Nuit
Heure de début	6 h 00	7 h 00	21 h 00	22 h 00
Intensité ($\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$) Réglage : 0= arrêt 1=1/4 2=2/4 3=3/4 4=4/4 AUTO (serre)	1	2	1	0

Annexe 2 : Conditions de culture des ancolies en compartiment de quarantaine

 <p>INRA Institut national de la recherche agronomique Centre de VERSAILLES</p>	<p>FICHE DE PROGRAMMATION CLIMATIQUE PLATE-FORME NSB3</p>		Codification :
			E/SER/014
Unité :			Version n° : 3
Date de dernière mise à jour : 03/03/2010			

Plate-forme NSB3		Numéro de la salle : 17		
CLIMAT TYPE : jour long Ancolie manip VIGS				
Date de programmation du climat type : 15/12/2009			A la demande de : Céline RIDEL	
CONDITIONS CLIMATIQUES :				
Période	Aube	Jour	Crépuscule	Nuit
Heure de début	6 h 15	7 h 15	21 h 15	22 h 15
Température °C	17	18	17	16
Hygrométrie % Hr	60	60	60	60
Temps de lissage : En minute		60 min		
CONDITIONS D'ECLAIRAGE :				
Période	Aube	Jour	Crépuscule	Nuit
Heure de début	6 h 15	h	h	22 h 15
Intensité ($\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$) Réglage : 0= arrêt 1=1/4 2=2/4 3=3/4 4=4/4 AUTO (serre)	AUTO	AUTO	AUTO	0

Annexe 3: Protocole pour clonage de produit PCR dans E. coli

1) Ligation :

Utilisation du kit promega A1360.

5 μ L de Tampon 2X

0,5 μ L de pGEMT (50ng)

3,5 μ L de produit PCR

1 μ L de T4 DNA ligase (3 unités/ μ l)

Soit 10 μ L final, mettre toute la nuit à 4°C.

2) Précipitation :

Pour 10 μ L de ligation ajouter :

-1 μ L d'acétate de sodium à 3M, PH 7

-25 μ L d'éthanol 95%

Laisser toute la nuit à -20°C (il est possible de ne laisser qu'1 heure).

Centrifuger à 15000 rpm à 4°C pendant 30 minutes.

Eliminer le surnageant à la pipette puis rincer avec 100 μ L d'éthanol 75%.

Centrifuger à 15000 rpm à 4°C pendant 10 minutes.

Eliminer le surnageant à la pipette et laisser sécher sur la paillasse.

Reprendre le culot dans 5 μ L d'eau stérile.

3) Transformation/électroporation des bactéries :

Mettre à l'avance dans la glace autant de cuve à électroporation que nécessaire.

Prendre autant de tubes de cellules électro-compétentes DH5 α que de produits de ligation et les placer dans la glace (aliquot de 40 μ L).

Allumer la hotte bactériologique et travailler dessous.

Mettre l'électroporateur sous tension et le régler à 1,25 KV.

Mélanger 1 μ L de produit de ligation avec 1 aliquot de 40 μ L de cellules compétentes.

Transvaser ce mélange dans une cuve à électroporation et la refermer.

Placer aussitôt la cuve dans la targelette de l'électroporateur et enclencher rapidement l'appareil en appuyant sur les 2 boutons « pulse » jusqu'au signal sonore.

Ajouter rapidement 1mL de milieu de culture LB, mélanger par pipetage.

Transvaser le tout dans un tube eppendorf.

Incuber 1 heure à 37°C sous agitation.

Préparer des boîtes de pétri contenant du milieu LB solide + ampicilline (20 μ L d'ampicilline à 100mg/mL pour 20mL de LB) + IPTG (IsoPropyl β -D-1-ThioGalactopyranoside) (16 μ L d'IPTG à 0,1 M pour 20mL de LB) + X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) (4 d'X-Gal à 20mg/mL pour 20mL de LB).

Etaler 100 μ L, 200 μ L et 700 μ L de la culture précédente avec un râseau.

Laisser sécher les boîtes entre-ouvertes sous la hotte puis les incuber toute la nuit à 37°C.

Annexe 4: Protocole d'extraction d'ADN plasmidique

Remplir un tube de 1,5 mL de culture bactérienne.

Centrifuger à vitesse maximum pendant 1 minute avec la centrifugeuse de paillasse (13000 rotations par minute) puis éliminer le surnageant à la pipette.

Ajouter 150 μ L de tampon 1 + RNase puis vortexer pour bien resuspendre le culot bactérien.

Ajouter 150 μ L de tampon 2, mélanger délicatement par retournement.

Laisser à température ambiante pendant 5 minutes.

Ajouter 150 μ L de tampon 3, mélanger délicatement par retournement.

Centrifuger à 15000 rpm (rotations par minute) pendant 10 minutes, à 4°C.

Récupérer le surnageant dans un nouveau tube de 1,5 mL.

Ajouter 950 mL d'éthanol 95% et vortexer.

Centrifuger à 15000 rpm pendant 10 minutes, à 4°C.

Éliminer le surnageant à la pipette.

Laver le culot d'ADN plasmidique avec 500 μ L d'éthanol à 75%.

Centrifuger à 15000 rpm pendant 10 minutes, à 4°C.

Éliminer le surnageant à la pipette et laisser le reste s'évaporer totalement sur la paillasse.

Resuspendre le culot avec 50 μ L de tampon d'élution (TE) ou d'eau distillée stérile.

Tampon 1 (resuspension bactérienne) :

Mélanger 10mL de Tris-HCl à 1M pH 7,5, 4 mL d'EDTA à 500mM, 100 μ L de RNase A à 20mg/mL et compléter à 200mL avec de l'eau distillée.

Tampon 2 (lyse cellulaire) :

Mélanger 2mL de soude 1M, 500 μ L de SDS 20% et compléter à 10mL avec de l'eau distillée.

Tampon 3 (précipitation des débris cellulaires) : Acétate de potassium 3M à pH 4,8.

Tampon d'élution (TE) :

Mélanger 1mL de Tris-HCl à 1M pH 7,5, 200 μ L d'EDTA à 500mM et compléter à 100mL avec de l'eau distillée.

Annexe 5: Préparation d'agrobactéries transformées pour la réalisation de VIGS

1) Pré-culture des agrobactéries transformées

A partir d'une colonie d'agrobactérie, ensemencer 2ml de LB liquide + 50 mg/L de Rifampicine, de Gentamicine et de Kanamycine.

Mettre à pousser sous agitation une nuit à 28°C.

2) Culture :

Préparer des flacons de 1000mL dans lesquels on met 500mL de LB + 50 mg/L de Rifampicine, de Gentamicine et de Kanamycine.

Ajouter 500µL de la pré-culture.

Mettre à pousser sous agitation 24 heures à 28°C.

3) Préparation du milieu d'infiltration :

Faire des solutions stocks de :

- MgCl₂ à 100mM stérilisé (pour 500mL d'eau peser environ 10,2g de MgCl₂)
- MES (2-[Nmorpholino]ethanesulfonic acid) à 100mM, PH 6 et stérilisé (pour 500mL d'eau peser environ 10,6g de MES)
- Acetosyringone (3'5'Dimethoxy-4'-hydroxyacetophenone) à 100mM (peser 20mg pour 1ml de méthanol). **Doit être préparé au dernier moment !**

Au dernier moment, mélanger :

90 mL de MgCl₂ à 100mM

90 mL de MES à 100mM

2 mL d'acétosyringone à 100mM

Qsp à 900 mL avec de l'eau osmosée.

4) Reprise des cultures dans le tampon d'infiltration :

Mesurer la DO des cultures à 600nm.

Centrifuger les cultures 10 minutes à 6000 rpm.

Reprendre les culots dans environ 250mL de tampon (ajuster pour avoir une DO de 2).

Laisser reposer 4 heures dans la glace.

Faire un mélange moitié-moitié de bactéries contenant le vecteur TRV1 et de bactéries contenant le vecteur TRV2+gène(s) à inhiber avant d'aller en serre pour infiltrer les plantes.

Annexe 6 : Protocole pour infiltration sous vide de plantes par agrobactéries transformées

 INRA Institut national de la recherche agronomique Centre de VERSAILLES Laboratoire de Biologie Cellulaire	VIGS TECHNIQUE D'AGRO INFILTRATION SOUS VIDE	N° identification : PLT-064-BIOTEC Version n° : 1
		Date d'application : 18/09/2007
		Dernière mise à jour :
		Date de retrait :
Fichier informatique :		Nombre de page : 5
Rédigé par : P. Laufs H. Ferry	Revu par :	Approuvé par :

Mots clés : agro infiltration, VIGS, NSB3

Sommaire

1. DOCUMENTS ASSOCIES OU CONSULTES
2. OBJECTIF
3. MATERIEL ET SCHEMAS
4. RESPONSABILITES
5. PROCEDURES
 - 5-1 Préparation de l'équipement
 - 5-2 Agro infiltration sous vide
 - 5-3 Nettoyage du matériel
 - 5-4 Suivi des cultures
 - 5-5 Fin de la manip
- 6 ANNEXES

1. DOCUMENTS ASSOCIES OU CONSULTES :

Gould, B., and Kramer, E.M. (2007). Virus-induced gene silencing as a tool for functional analyses in the emerging model plant *Aquilegia* (columbine, Ranunculaceae). *Plant Methods* 3, 6.

2. OBJECTIF :

Cette technique est mise en œuvre pour réaliser une analyse fonctionnelle d'un gène d'intérêt en réduisant son niveau d'expression par la technique du VIGS (Virus-Induced Gene Silencing)

3. MATERIEL ET SCHEMAS :

MATERIEL

Désignation	Localisation	Fiche technique
Pompe à vide		
Cloche à vide	Matériel réservé pour cette expérimentation en zone de confinement	
Filtre Acro 0.2µ PTFE	Armoire phytotron	FT 09 064
Mini serre	Placard circulation des chambres	
Sac poubelle	Placard circulation des chambres	
Barquette alimentaire	Placard circulation des chambres	
Timer (minuteur)	Matériel réservé pour cette expérimentation en zone de confinement	
Bécher	Matériel réservé pour cette expérimentation en zone de confinement	
Pissette eau de javel	Matériel réservé pour cette expérimentation en zone de confinement	
Pince	Matériel réservé pour cette expérimentation en zone de confinement	
Plantoir	Matériel réservé pour cette expérimentation en zone de confinement	

Ciseaux	Matériel réservé pour cette expérimentation en zone de confinement	
Rouleau de papier « essuie-tout »		

LES EQUIPEMENTS DE PROTECTION INDIVIDUELLE

Désignation	localisation	Fiche technique
Blouse jetable	Sas Homme ou Femme	FT 10 020
Gants à usage unique nitrile	Placard circulation des chambres	FT 10 032
Sur chaussures	Sas Homme ou Femme	FT 10 022

4. RESPONSABILITES :

Cette technique sera mise en œuvre dans une chambre climatisée de la zone de quarantaine ou dans un compartiment de quarantaine de la plate-forme NSB3. Cette salle sera fermée et l'accès limité aux expérimentateurs et au personnel suivant les cultures en se prescrivant aux obligations.

5. PROCEDURES :**5-1 Préparation de l'équipement**

- La pompe à vide est transportée dans un sac fermé pour être disposée dans la chambre climatisée où les plantes sont cultivés et seront inoculées.
- Couvrir le plan de travail, en l'occurrence le tablar avec un sac poubelle ouvert pour le protéger et permettre un nettoyage aisé.
- Amener dans la chambre climatisée tous les équipements nécessaires : cloches à vide, pince, plantoir, papier « essuie-tout », barquettes alimentaires, pissette d'eau de javel, filtre neuf pour protéger la pompe à vide.
- Amener un sac autoclavable qui servira de poubelle sensible.
- Ouvrir l'emballage du filtre et le disposer sur l'embout du tuyau raccordé à la cloche.
- La pompe sera positionnée sous le tablar et protégée par un sac poubelle.
- Brancher l'alimentation électrique de la pompe sur une des prises de courant disponible.
- Prévoir 2 barquettes alimentaires par souches différentes utilisées.
- Réaliser des perforations sur le fond d'une des barquettes.



5-2 Agro infiltration sous vide

Les suspensions d'agro bactéries sont préparées au laboratoire et transportées dans des conteneurs étanches.

Les plantes devant être agro infiltrées sous vide, effectuer la demande de barquettes pour pouvoir repiquer les plantes après transformation.

Port obligatoire des équipements de protection individuelle (E.P.I.).

- Avant de commencer mettre une blouse neuve par-dessus la première et une deuxième paire de sur-chaussures.
- Mettre des gants en nitrile.
- Prévoir de laisser une boîte de gants à usage unique dans la salle en retrait de la zone de travail pour éviter les souillures par éclaboussures.

Changement obligatoire de gants entre chaque nouvelle suspension bactérienne.

- Déterrer les plantes à l'aide du plantoir.
- Laver les racines dans le bécher contenant de l'eau de ville.
- Dans la première barquette alimentaire, verser délicatement la suspension d'agro bactéries.
- Poser les plantes à plat dans la barquette.
- Mettre la barquette perforée dans la première.
- Introduire l'ensemble dans la cloche à vide.
- Poser le couvercle de la cloche à vide.
- Raccorder le filtre au tuyau de la pompe.
- Mettre la pompe en marche et tirer au vide durant 2 minutes.



Ne pas manipuler l'interrupteur de la pompe avec des gants contaminés. Laisser tourner le timer en continu, abrité derrière un plastique transparent afin de ne pas le contaminer.

- Fermer le robinet de la cloche.
- Eteindre la pompe à vide et la déconnecter.
- Attendre 2 minutes.
- Casser le vide doucement en ouvrant progressivement le robinet de la cloche.
- Egoutter les plantes au dessus d'un papier essuie-tout-posée sur le plastique de protection.
- Repiquer les plantes dans une nouvelle barquette
- Couvrir les plantes avec une mini serre.



5-3 Nettoyage du matériel

- Mettre de l'eau de javel dans le b cher ayant servit au lavage des racines.
- La suspension d'agro bactérie sera reversée dans son flacon initial. Sa surface extérieure sera nettoyée à l'eau de javel et le flacon sera ramené au laboratoire dans une enceinte close et sera autoclavé.
- Les barquettes contaminées seront jetées dans un sac autoclavable.
- Essuyer la cloche à vide avec du papier « essuie-tout »
- Passer une solution d'eau de javel contenue dans la pissette sur toute la cloche, sur le câble d'alimentation électrique de la pompe (après l'avoir débranchée) et sur le tuyau reliant la pompe à la cloche à vide
- Essuyer avec du papier « essuie-tout ».
- Tous les papiers utilisés sont jetés dans un sac autoclavable.
- Passer une deuxième fois une solution d'eau de javel sur la cloche, câble et tuyau.
- A la fin de la manip, jeter les plastiques de protection.
- Jeter le filtre de protection de la pompe à vide dans le sac autoclave.
- Si nécessaire, nettoyer les parois.
- Tout le petit matériel restera dans la salle jusqu'à la fin de l'expérimentation.
- Les gants, la deuxième blouse, les sur-chaussures seront jetées dans un sac autoclavable dans la salle même.
- Fermer la salle à clef.

5-4 Suivi des cultures

L'arrosage des barquettes contenant les plantes agro infiltrées sera réalisé uniquement par sub-irrigation. Il faut éviter les éclaboussures sur les plantes.

Il faut en aucun cas toucher les plantes, car le virus utilisé TRV est transmissible par contact.

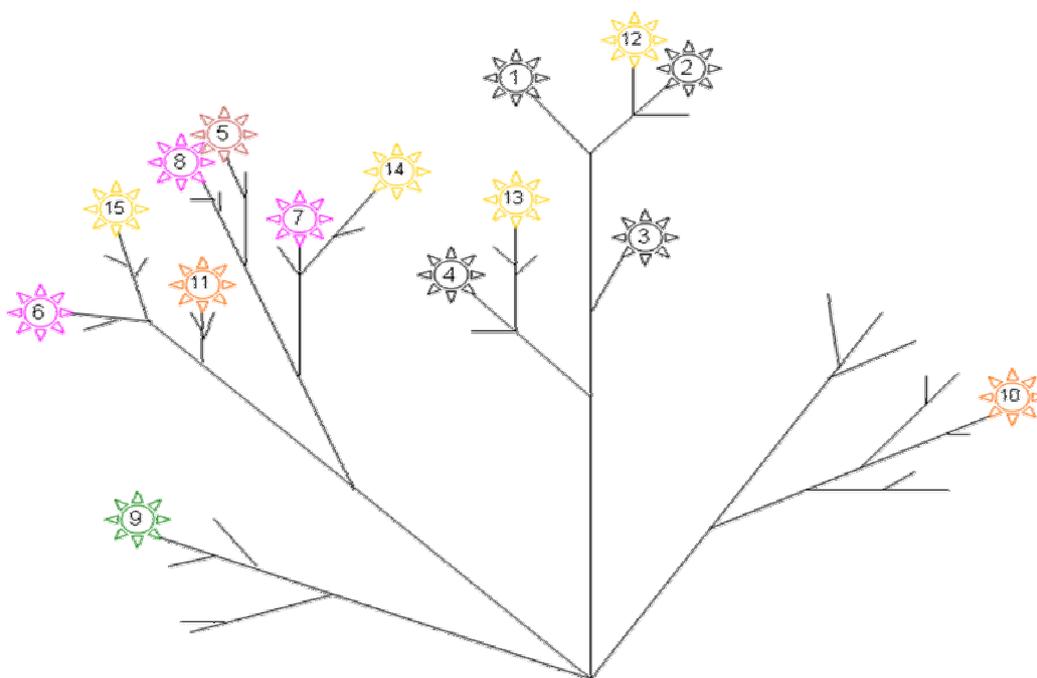
5-5 Fin de la manip

- Elimination des plantes et barquettes dans un sac autoclavable.
- Elimination de l'eau de lavage des racines par autoclavage avec les autres déchets.
- Les déchets sont collectés puis autoclavés selon les modes opératoires PLT-058-DESINF « Collectes des déchets pour destruction en autoclave de la plateforme NSB3 » et MAT-063-UTILIS « Règles d'utilisation de l'autoclave st rinove sur la plate-forme NSB3 »
- Le petit matériel et la pompe à vide seront nettoyés une dernière fois à l'eau de javel et essuyés avant leur sortie de la salle de culture.
- Le nettoyage de la salle est réalisé selon les modes opératoires SER-055-DESINF « procédure de nettoyage, désinfection et stérilisation pour la plateforme NSB3 » SER-056-DESINF « procédure de nettoyage et désinfection du sol et des parois verticales de la plateforme NSB3 »

Annexe 7 : Positionnement des fleurs sur une plante d'Origami

Photographiées le:

 29/03/10	 06/04/10	 14/04/10
 31/03/10	 08/04/10	 15/04/10
 01/04/10	 09/04/10	 16/04/10 </td
 02/04/10	 12/04/10	 19/04/10
 05/04/10	 13/04/10	



Annexe 8 : Exemple de notations effectuées sur les ancolies

construction	série	infiltration	numéro plante	numéro fleur	nbre de sépalés	nbre d'éperons	nbre d'étamines	nbre de carpelles	ANS visible?	phénotype sépalés?	sep bord blanc (=1)	sep conversion partielle (=2)	sep conversion totale (=3)	date de photo	commentaires
TCP1-2	1	+ feuilles	9	1	5	5	72	5	-	-	0	0	0	25/05/2010	
TCP1-2	1	+ feuilles	9	2	5	5	61	5	-	-	0	0	0	25/05/2010	
TCP1-2	1	+ feuilles	9	3	5	5	67	5	-	-	0	0	0	25/05/2010	
TCP1-2	1	+ feuilles	9	4	5	5	68	6	-	-	0	0	0	26/05/2010	
TCP1-2	1	+ feuilles	9	5	5	5	75	5	-	-	0	0	0	31/05/2010	stérile?
TCP1-2	1	+ feuilles	9	6	5	5	68	5	-	-	0	0	0	31/05/2010	
TCP1-2	1	+ feuilles	9	7	3	3	69	7	+	+	0	0	0	31/05/2010	et bizarre
TCP1-2	1	+ feuilles	10	1	5	5	64	5	+	-	0	0	0	29/03/2010	qq anthères plus petites que les autres
TCP1-2	1	+ feuilles	10	2	5	5	54	5	+	-	0	0	0	06/04/2010	
TCP1-2	1	+ feuilles	10	3	5	5	60	5	-	-	0	0	0	12/04/2010	
TCP1-2	1	+ feuilles	10	4	5	5	50	5	-	-	0	0	0	12/04/2010	
TCP1-2	1	+ feuilles	10	5	na	na	na	na	na	na	na	na	na	12/04/2010	petite, avortée
TCP1-2	1	+ feuilles	10	11	5	5	57	6	+	-	0	0	0	23/04/2010	
TCP1-2	1	+ feuilles	10	17	5	5	66	5	-	-	0	0	0	03/05/2010	
TCP1-2	1	+ feuilles	10	18	5	5	68	5	-	-	0	0	0	03/05/2010	
TCP1-2	1	+ feuilles	10	19	5	5	71	5	+	-	0	0	0	05/05/2010	
TCP1-2	1	+ feuilles	10	20	5	5	38	5	+	-	0	0	0	05/05/2010	
TCP1-2	1	+ feuilles	10	21	5	5	57	5	+	+	2	1	0	06/05/2010	3 sep bord blanc
TCP1-2	1	+ feuilles	10	22	5	5	57	5	+	+	1	0	0	07/05/2010	1 sep bord blanc
TCP1-2	2	- feuilles	53	1	5	4	62	5	-	+	2	0	0	07/06/2010	2 sep/pet + 1 et bizarre congel tout
TCP1-2	2	- feuilles	54	1	3	3	68	7	+	-	0	0	0	31/03/2010	fanée+pas d'anthères
TCP1-2	2	- feuilles	54	2	5	5	58	5	-	-	0	0	0	09/04/2010	pas de pollen?
TCP1-2	2	- feuilles	54	3	5	5	55	5	-	-	0	0	0	20/04/2010	
TCP1-2	2	- feuilles	54	6	5	5	64	6	+	-	0	0	0	11/05/2010	
TCP1-2	2	- feuilles	54	7	5	5	na	5	-	-	0	0	0	03/06/2010	
TCP1-2	2	- feuilles	54	8	5	5	76	5	-	-	0	0	0	03/06/2010	
TCP1-2	2	- feuilles	54	9	5	5	80	5	-	-	0	0	0	03/06/2010	
TCP1-2	2	- feuilles	54	10	5	5	63	5	-	-	0	0	0	03/06/2010	
TCP1-2	2	- feuilles	54	11	5	5	70	6	-	+	1	0	0	03/06/2010	1 sep bord blanc congel+congel reste
TCP1-2	2	- feuilles	55	1	5	5	79	6	+	+	0	0	1	29/03/2010	1 sep /pet
TRV2ANS	1	+ feuilles	27	17	5	5	54	5	+	+	1	0	0	30/04/2010	1 sep bord blanc
TRV2ANS	1	+ feuilles	27	18	5	5	52	5	+	-	0	0	0	30/04/2010	
TRV2ANS	1	+ feuilles	27	19	5	5	58	5	+	-	0	0	0	30/04/2010	
TRV2ANS	1	+ feuilles	27	20	5	5	65	6	-	-	0	0	0	30/04/2010	
TRV2ANS	1	+ feuilles	27	21	5	5	65	5	-	-	0	0	0	30/04/2010	
TRV2ANS	1	+ feuilles	27	22	5	5	54	4	-	-	0	0	0	03/05/2010	

Annexe 9 : Protocole d'extraction des ARN totaux

Broyer les tissus congelés dans de l'azote liquide.

Ajouter 500 μ L de trizol puis vortexer.

Recongeler les tissus dans l'azote liquide puis les décongeler.

Incuber 5 minutes à température ambiante.

Centrifuger pendant 10 minutes à 12000 g à 4°C.

Transférer le surnageant dans un nouveau tube avec 100 μ L de chloroforme.

Homogénéiser au vortex 15 secondes (création d'une émulsion),

Incuber pendant 2 à 15 minutes à température ambiante.

Centrifuger à 12000 g à 4°C pendant 15 minutes.

Transférer le surnageant dans un nouveau tube.

Précipiter les ARN avec 0,6 volumes d'isopropanol (250 μ L).

Incuber à température ambiante pendant 10 minutes.

Centrifuger à 12000 g à 4°C pendant 10 minutes.

Éliminer le surnageant et laver le culot avec 1mL d'éthanol à 75%

Laisser sécher à l'air libre.

Solubiliser les culots d'ARN dans 100 μ L d'eau stérile puis les conserver à -20°C.

NB : Ces ARN doivent être dosés, traités à la DNase et contrôlés sur gel d'agarose avant leur utilisation.

Références bibliographiques

- Baulcombe D.C. (1999). Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 109-113.
- Bowman J.L, Sakai H., Jack T., Weigel D., Mayer U., and Meyerowitz E. M. (1992). SUPERMAN, a regulator of floral homeotic genes in Arabidopsis. *Development* 114, 599-515.
- Bowman JL (1997). Evolutionary conservation of angiosperm flower development at the molecular and genetic levels. *Journal of Biosciences* 22: 515–527.
- Becker A., Lange M. (2010) VIGS-Genomics goes functional. *Trends in Plant Science*. 15: 1-4
- Benedito V.A., Visser P. B., Angenent G. C. and Krens F. A. (2004) The potential of virus-induced gene silencing for speeding up functional characterization of plant genes. *Genet. Mol. Res.* 3 (3): 323-341
- Brigneti G, Martin-Hernandez AM, Jin H, Chen J, Baulcombe DC, Baker B, Jones JD. (2004): Virus-induced gene silencing in *Solanum* species. *Plant Journal*, 39(2):264-272.
- Burch-Smith TM, Anderson JC, Martin GB, Dinesh-Kumar SP (2004): Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *Plant Journal*, 39(5):734-746.
- Burch-Smith TM, Schiff M, Liu Y, Dinesh-Kumar SP (2006): Efficient virus induced gene silencing in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 142(1):21-27.
- Buzgo M, Soltis DE, Soltis PS (2004). Floral developmental morphology of Amborella trichopoda (Amborellaceae). *International Journal of Plant Sciences* 165: 925–947.
- Citerne H., Jabbour F., Nadot S. and Damerval C. (2010) The Evolution of Floral Symmetry. *Advances in Botanical Research* 54, 85-137
- Chen J.C, Jiang C.Z and Reid M.S (2005): Silencing a prohibitin alters plant development and senescence. *The Plant Journal* 44:16-24.

- Coen, E. S. and Meyerowitz, E. M. (1991). The war of the whorls: Genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353, 31–37.
- Corley SB, Carpenter R, Copsey L, Coen E. (2005). Floral asymmetry involves an interplay between TCP and MYB transcription factors in *Antirrhinum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 102: 5068–5073.
- Cubas P, Lauter N, Doebley J, Coen E. (1999). The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development. *The Plant Journal* 18: 215–222.
- Dinesh-Kumar S.P, Anandalakshmi R., Marathe R., Schiff M. And Liu Y. (2003). Virus-Induced Gene Silencing. *Plant Functional Genomics: Methods and Protocols*. 236: 287-293.
- Ding XS, Schneider WL, Chaluvadi SR, Mian MA, Nelson RS (2006) Characterization of a Brome mosaic virus strain and its use as a vector for gene silencing in monocotyledonous hosts. *Molecular Plant Microbe Interactions* 19: 1229–1239
- Di Stilio V. S, Kumar R. A, Oddone A.M, Tolkin T. R., Salles P., and McCarty K. (2010): Virus-Induced Gene Silencing as a tool for comparative functional studies in *Thalictrum*. *PLoS ONE* 5(8): e12064.
- Ditta, G., Pinyopich A., Robles P., Pelaz S. and Yanofsky M. (2004). The SEP4 gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity. *Curr Biol* 14: 1935-1940.
- Drea S., Hileman L. C, de Martino G and F Irish V. (2007) Functional analyses of genetic pathways controlling petal specification in poppy. *Development* 134: 4157-4166.
- Durfee T., Roe J. L., Sessions R. A., Inouye C., Serikawa K., Feldmann K. A., Weigel D. and Zambryski P. C. (2003). The F-box containing protein UFO and AGAMOUS participate in antagonistic pathways governing early petal development in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100, 8571–8576.
- Eamens, Wang, Smith, Waterhouse, (2008) RNA silencing in plants: Yesterday, Today, and Tomorrow. *Plant Physiol*. 147(2):456-68.

- Ekengren, S.K., Liu Y., Schiff M., Dinesh-Kumar S.P. and Martin G.B. (2003) Two MAPK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato. *Plant Journal*. 36: 905–917.
- Fire et Mello, (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669):806-11.
- Glover B. (2007). Understanding flowers and flowering: an integrated approach. Oxford: Oxford University Press.
- Gomez, J., Perfectti F. and Camacho J. (2006): Natural selection on *Erysimum mediohispanicum* flower shape: Insights into the evolution of zygomorphy. *Am Nat* 168(4): 531-545.
- Gould B, Kramer EM (2007): Virus-induced gene silencing as a tool for functional analyses in the emerging model plant *Aquilegia* (columbine, Ranunculaceae). *Plant Methods*, 3:6.
- Hein I, M. Barciszewska-Pacak, Hrubikova K., Williamson S., Dinesen M., Soenderby I.E, Sundar S., Jarmolowski A., Shirasu K., Lacomme C. (2005): Virus-induced gene silencing-based functional characterization of genes associated with powdery mildew resistance in barley. *Plant Physiology* 138: 2155–2164
- Hileman LC, Drea S, Martino G, Litt A, Irish VF (2005): Virus-induced gene silencing is an effective tool for assaying gene function in the basal eudicot species *Papaver somniferum* (opium poppy). *Plant Journal*. 44(2):334-341.
- Holzberg S, Brosio P, Gross C, Pogue GP (2002): Barley stripe mosaic virus induced gene silencing in a monocot plant. *Plant Journal* 30:315–327.
- Jabbour F. (2009) Homoplasie de la symétrie bilatérale chez les eudicots. Quels rôles de l'architecture florale et du développement ? Quelles bases génétiques ? Thèse de l'Université Paris XI Orsay.
- Jabbour F., Nadot S. and Damerval C.. (2009). Evolution of floral symmetry: a state of the art. *C. R. Biologies* 332 : 219–231
- Jack, T. (2004). Molecular and genetic mechanisms of floral control. *Plant Cell* 16: S1-S17.

- Kanno, A., Saeki, H., Kameya, T., Saedler, H. and Theissen, G. (2003). Heterotopic expression of class B floral homeotic genes supports a modified ABC model for tulip (*Tulipa gesneriana*). *Plant Molecular Biology* 52, 831–841.
- Kramer E. (2007). Understanding the genetic basis of floral diversity. *BioScience* 57 (6) 479-487.
- Kramer E., Holappa L., Gould B., Jaramillo M., Setnikov D. and Santiago P. (2007). Elaboration of B gene function to include the identity of novel floral organs in the lower eudicot *Aquilegia*. *Plant Cell* 19: 750-766.
- Kramer E; M, Hodges (2010). *Aquilegia* as a model system for the evolution and ecology of petals. *Philosophical Transaction of the Royal Society B*. 365, 477–490
- Krizek B. A. and Meyerowitz E. M (1996) The Arabidopsis homeotic genes APETALA3 and PISTILLATA are sufficient to provide the B class organ identity function. *Development* 122: 11-22
- Krizek B. A. and Fletcher J. C (2005) Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide. *Nature Reviews Genetics* 6: 688-698.
- Krizek B. A., Lewis M. W. and Fletcher J. C. (2006). RABBIT EARS is a secondwhorl repressor of AGAMOUS that maintains spatial boundaries in Arabidopsis flowers. *Plant Journal* 45, 369–383.
- Kumagai MH, Donson J., della-Cioppa G., Harvey D., Hanley K., Grill L.K. (1995): Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *PNAS* 92: 1679–1683
- Senthil-Kumar M., Hema R., Anand A., Kang L., Udayakumar M., Kirankumar S. Mysore (2007) A systematic study to determine the extent of gene silencing in *Nicotiana benthamiana* and other Solanaceae species when heterologous gene sequences are used for virus-induced gene silencing. *New Phytologist* 176 (4) : 782–791
- Liu Y., Schiff M. and Dinesh-Kumar S.P. (2002). Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant Journal*. 31 :777-786.

- Liu Y, and Page J. E. (2008). Optimized cDNA libraries for virus-induced gene silencing (VIGS) using tobacco rattle virus. *Plant Methods*, 4:5
- Lodish et al. (2005) Biologie moléculaire de la cellule. 3ème édition Publié par De Boeck Université.
- Lu R, Martin-Hernandez AM, Peart JR, Malcuit I, Baulcombe DC (2003): Virus-induced gene silencing in plants. *Methods*, 30(4):296-303.
- Malcomber S.T and Kellogg E.A (2005): *SEPALLATA* gene diversification: brave new whorls. *TRENDS in Plant Science*, 10(9):427-435.
- Matthews R.E.F (1980). Classification et nomenclature des virus. Troisième rapport du comité international de taxonomie des virus. Masson, Paris : 193-194.
- Moore M.J., Bell C.D., Soltis P.S. and Soltis D.E. (2007): Using plastid genom-scale data to resolve enigmatic relationships among basal angiosperms. *PNAS* 104(49): 19363-19368.
- Pelaz, S., Ditta G., Baumann E., Wisman E. and Yanofsky M. (2000). B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature* 405: 200-203.
- Purkayastha A. and Dasgupta I. (2009). Virus-induced gene silencing: A versatile tool for discovery of gene functions in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 47(11-12): 967-976.
- Ratcliff F., Martin-Hernandez A.M. and Baulcombe D.C. (2001). Technical advance. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant Journal*. 25: 237-245.
- Robertson D (2004): VIGS vectors for gene silencing: Many targets, many tools. *Annual Review of Plant Biology*. 55:495-519.
- Ruiz M.T., Voinnet O. and Baulcombe D.C. (1998): Initiation and maintenance of virus induced gene silencing. *Plant Cell* 10: 937-946.
- Soltis, D.E., Soltis P.S, Kim S., Chanderbali A. and Buzgo M. (2006): Expression of Floral Regulators in Basal Angiosperms and the Origin and Evolution of ABC - Function. *Advances in Botanical Research*. 44: 483-506.

- Soltis, D.E., Chanderbali A., Kim S., Buzgo M. and Soltis P.S (2007): The ABC Model and its Applicability to Basal Angiosperms. *Annals of Botany* 100: 155-163.
- Soltis D. E., Bell C. D, Kim S. and Soltis P.S (2008): Origin and early evolution of Angiosperms. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1133: 3-25.
- Specht C.D and Bartlett M.E (2009). Flower Evolution: The Origin and Subsequent Diversification of the Angiosperm Flower. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 40:217-243.
- Theissen G., Becker A., Di Rosa A., Kanno A., Kim J., et al. (2000): A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Molecular Biology* 42: 115-149.
- Theissen G. (2001). Development of floral organ identity: stories from the MADS house. *Current Opinion of Plant Biology* 4: 75-85.
- Unver T. and Budak H. (2009) Virus-induced gene silencing, a post transcriptional gene silencing method. *International Journal of Plant Genomics* Article ID 198680.
- van Tunen, A. J., Eikelboom, W. and Angenent, G. C. (1993). Floral organogenesis in Tulipa. *Flowering Newsletter* 16, 33–38.
- Voinnet, O. (2001) RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet.* 17: 449-459.
- Wege S, Scholz A, Gleissberg S, Becker A (2007): Highly efficient virusinduced gene silencing (VIGS) in California poppy (*Eschscholzia californica*): An evaluation of VIGS as a strategy to obtain functional data from non-model plants. *Annals of Botany*. 100(3):641-649.
- Waterhouse P.M, Wang M.B., and Lough T. (2001) Gene silencing as an adaptative defense against viruses. *Nature* 411: 834-842.
- Zahn L.M, Feng B. and Ma H. (2006). Beyond the ABC-Model: Regulation of Floral Homeotic Genes. *Advances in Botanical Research*. 44: 163-207.
- Zhang W., Kramer E.M. and Davis C. C. (2010) Floral symmetry genes and the origin and maintenance of zygomorphy in a plant pollinator mutualism. *PNAS* 104 (14): 6388–6393.

Zhu and Dinesh-Kumar, (2009) libre RNA Interference, Methods for Plants & animals chapitre 2 p 26-30 edité par T.Doran & C.Helliwell.

Caractérisation fonctionnelle des gènes homologues de *CYCLOIDEA* identifiés chez *Aquilegia coerulea* 'Origami'.

RESUME

La zygomorphie (ou symétrie bilatérale) est déterminée par l'interaction de 4 facteurs de transcription chez l'espèce modèle *Antirrhinum majus*. Le plus important est codé par le gène *CYCLOIDEA* (*CYC*) qui est exprimé dans la partie dorsale de la fleur, où il freine la croissance des organes. Des homologues du gène *CYC* ont été caractérisés chez 5 espèces de Renonculacées. Parmi ces espèces, l'ancolie (qui est actinomorphe) possède 2 gènes homologues de *CYC* qui s'expriment dans les boutons floraux. Les objectifs de mon travail ont été d'évaluer le rôle de ces gènes dans la morphologie florale et de préparer de futures expérimentations complémentaires à celle-ci. Pour cela, j'ai utilisé une méthode d'inactivation de gènes, le « VIGS » (*Virus Induced Gene Silencing*), que j'ai appliquée sur différentes espèces de Renonculacées. L'inhibition de l'expression des homologues de *CYC* n'a pas modifiée la symétrie florale de l'ancolie, mais elle semble entraîner des conversions homéotiques de sépales en pétales et d'étamines en pétales. Nous en avons déduit que, chez l'ancolie, ces gènes devaient jouer un rôle soit dans la régulation des gènes responsables de l'identité des organes floraux soit dans la limitation de leurs zones d'action. De plus, nous avons obtenu des résultats prometteurs sur les autres espèces testées.

Mots clés: *CYCLOIDEA*, symétrie florale, fleur, conversion homéotique, Ancolie, Virus Induced Gene Silencing (VIGS), TCP.