



UNIVERSITE DE STRASBOURG

RESUME DE LA THESE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie Végétale

Présentée par : **Romon Marjorie**

Titre : Rôle du gène de floraison *VvFT* dans la mise en place de la floraison chez la vigne.

Mise en évidence des mécanismes d'extinction génique chez la vigne et de leurs réponses face aux stress abiotiques.

Unité de Recherche : UMR 1131 INRA/UDS Santé de la Vigne et Qualité du Vin

Directeur de Thèse : Masson Jean - DR INRA, HDR de l'UDS

Localisation : INRA Colmar

ECOLES DOCTORALES :

(cocher la case)

<input type="checkbox"/> ED - Sciences de l'Homme et des sociétés	<input type="checkbox"/> ED 269 - Mathématiques, sciences de l'information et de l'ingénieur
<input type="checkbox"/> ED 99 – Humanités	<input type="checkbox"/> ED 270 – Théologie et sciences religieuses
<input type="checkbox"/> ED 101 – Droit, sciences politique et histoire	<input type="checkbox"/> ED 413 – Sciences de la terre, de l'univers et de l'environnement
<input type="checkbox"/> ED 182 – Physique et chimie physique	<input checked="" type="checkbox"/> ED 414 – Sciences de la vie et de la santé
<input type="checkbox"/> ED 221 – Augustin Cournot	
<input type="checkbox"/> ED 222 - Sciences chimiques	

Partie I : Rôle du gène de floraison *VvFT* dans la mise en place de la floraison chez la vigne.

La floraison résulte de l'intégration de signaux à la fois environnementaux et endogènes à la plante. Les voies de signalisation correspondantes ont été largement étudiées chez *Arabidopsis thaliana*. La photopériode est perçue au niveau des feuilles. En condition de jour long, des photorécepteurs vont activer l'expression du gène *Flowering locus T (FT)*. Le gène *FT* intègre également d'autres voies activatrices de la floraison, notamment les voies impliquant les gibbérellines. Cette hormone active aussi un autre gène intégrateur de la floraison *Suppressor of overexpression of CO1 (SCO1)*. Le gène *FT* code pour un facteur de transcription qui circule depuis les feuilles via le phloème vers le méristème pour induire la floraison. *FT* serait le fameux « florigène » décrit depuis plusieurs siècles. La protéine *Ft* fonctionne dans le méristème en hétéro-dimère en interagissant avec la protéine *Fd* pour activer l'expression des gènes *APETALA 1 (AP1)* et *LEAFY (LFY)* qui vont induire la formation des organes floraux.

De nombreux orthologues de gènes de floraison ont été caractérisés chez la vigne et une partie des fonctions sont conservées. Les gibbérellines activent le débourrement des bourgeons latents et stimulent la formation de vrilles mais contrairement à *Arabidopsis*, celles-ci semblent inhiber la formation d'inflorescences. Par ailleurs, comme la floraison de la vigne n'est pas sensible à la photopériode, on peut se demander si l'orthologue du gène *FT (VvFT)* a tout de même un rôle intégrateur au niveau des feuilles et s'il active l'expression de l'orthologue du gène *LFY (VFL)*. Dans la première partie de ma thèse, afin de mieux comprendre les rôles respectifs de *FT* et des gibbérellines dans la floraison de la vigne, nous avons conduit une analyse moléculaire avec un matériel original : (i) un porte-greffe 41B transformé avec une construction contenant le gène *VvFT* sous contrôle du promoteur 35S et (ii) une plante naine, dérivée du Pinot Meunier, insensible aux voies de signalisation impliquant les gibbérellines, suite à une mutation dans le gène *GA-INSENSITIVE (GAI)*.

Nous avons réalisé une analyse quantitative de l'expression des gènes de floraison *VvFT* et *VFL* à partir d'ARNs extraits de feuilles, de vrilles, de bourgeons latents et d'inflorescences de la vigne naine, du transformant du porte-greffe 41B 35S::*VvFT* et du cépage Riesling 49. Des transcrits du gène *VvFT* sont difficilement détectables dans les feuilles et les bourgeons. A l'inverse, des niveaux très élevés sont détectés dans les inflorescences, plus particulièrement chez un cépage très florifère, le Riesling, suggérant un lien entre floraison et *VvFT*. Dans les vrilles, les niveaux de transcrits de *VvFT* sont également élevés, quoique 4 à 10 fois inférieurs à ceux observés dans les inflorescences. Chez la vigne naine, les gibbérellines inhibent significativement l'expression de *VvFT*. Le développement de ces organes semble bloqué au profit d'une transformation en inflorescence.

Nous avons étudié le niveau de transcrits de *VFL* comme indicateur moléculaire de transition vers la floraison. Dans les feuilles, le niveau de *VFL* est faible chez tous les génotypes, à l'exception du transformant 41B 35S::*VvFT* sans pour autant que nous ayons observé de différenciation de bourgeons floraux à partir des feuilles. Dans les vrilles, les niveaux de *VFL* observés sont en accord avec ce qui est publié. Pourtant, comme les gibbérellines bloquent l'expression de *VvFT* dans les vrilles, on pouvait s'attendre à une expression plus élevée de *VFL* alors que ces vrilles se transforment en inflorescences. Les différences les plus marquées ont été observées dans les bourgeons latents et les inflorescences avec des niveaux de transcrits de 10 à 100 fois plus élevés que dans les organes végétatifs. Nos résultats suggèrent que *VvFT* ainsi que les gibbérellines activent l'expression de *VFL* dans les bourgeons latents alors que leur action est opposée dans les inflorescences.

Notre étude montre que les gibbérellines ou/et le gène *VvFT* activent les gènes de floraison comme *VFL*, mais avec des réponses très différentes entre la vrille, les bourgeons latents et les inflorescences. Il y a bien au moins deux voies d'activation de la floraison chez la vigne, une impliquant *VvFT* et l'autre les gibbérellines, et celles-ci sont distinctes et n'impliquent pas une perception d'un signal de 'type florigène' au niveau de la feuille, contrairement à ce qui est décrit chez *Arabidopsis*.

Partie II : Mise en évidence des mécanismes d'extinction génique chez la vigne et de leurs réponses face aux stress abiotiques.

Une partie des réactions de défenses face aux agressions biotiques, comme celles dues aux virus, implique notamment un mécanisme de défense nommé le « silencing ». La première étape de ce mécanisme commence par la reconnaissance par les protéines DICER 2 (DCL2) et DICER 4 (DCL4) de l'ARN viral double brin. Puis ces DCL vont cliver cet ARN en petites molécules d'ARN de 21nt appelées siRNA. Ces siRNA vont être pris en charge par le complexe protéique RNA-induced silencing complex (RISC) pour cibler les ARN complémentaires et les dégrader. Mais ces siRNA servent également d'amorces pour des RNA polymérase RNA dépendantes (*RdR*) qui vont amplifier ainsi le système avec la production de siRNA secondaires. Ces petits ARNs circulent de cellule à cellule et, ainsi, assurent une systémie dans la plante. Chez *Arabidopsis* et *Nicotiana benthamiana*, ce mécanisme semble ne plus fonctionner à une température inférieure à 15°C avec, notamment, une expression de *RdR6* et *RdR1* très fortement diminuée. Une mise en évidence complète au niveau phénotypique et moléculaire n'a pas été proposée, à ce jour, chez la vigne. De plus, les études de la sensibilité de ces mécanismes à basse température et de la systémie, ont toute leur importance chez une plante pérenne comme la vigne, cultivée sous forme d'assemblage entre un porte-greffe et un greffon et exposée à de grandes amplitudes de températures.

Dans la seconde partie de ma thèse, nous avons produit des plantes transgéniques de la lignée PN40024 contenant soit le gène codant la GFP, soit une construction tige-boucle GF-FG, soit les deux. Les cals embryogènes transgéniques GFP sont fluorescents ainsi que les plantes qui en sont dérivées. Les cals embryogènes transgéniques GFP+GF-FG sont également fluorescents. Par contre, nous avons observé une disparition totale de la fluorescence chez ces PN40024 GFP+GF-FG, dès l'apparition des premières feuilles, lors de la régénération et chez la plante entière. Au cours de la multiplication végétative de ces plantes, la GFP est éteinte dans les feuilles différenciées alors que les zones méristématiques conservent une fluorescence. L'étude moléculaire a mis en évidence des petits ARNs de 21nt et 24nt produits à partir de la construction tige-boucle GF-FG. Des petits ARNs secondaires de 21nt produit à partir de la séquence de la GFP ont été également détectés. Ainsi, nos résultats au niveau phénotypique et moléculaire montrent, pour la première fois, que le silencing fonctionne chez la vigne avec (i) une extinction de la GFP associée à la différenciation des tissus somatiques (ii) une production de petits ARNs et (iii) une production de petits ARNs secondaires suggérant que le système d'amplification impliquant *RdR6* et *RdR1* est actif chez la vigne, du moins à 26°C.

Nous avons cloné le gène *RdR6* de la vigne à partir de la séquence référence du Pinot Noir 40024 disponible sur le site du Genoscope. Alors que les analyses en bioinformatique prédisent un gène composé de cinq exons et quatre introns et une taille totale de 4852nt, nos résultats montrent que la séquence de *VvRdR6* exprimée fait 4936nt et que le gène est organisé en deux exons et un intron. Cette architecture est semblable à celle trouvée chez *Arabidopsis*.

Le matériel végétal modèle que nous avons produit et le clonage de *RdR6* vont permettre une étude approfondie des réponses du silencing de la vigne aux stress abiotiques ainsi qu'une étude de la systémie en réalisant des greffages. Ce matériel permettra également de cribler une large collection de virus de vigne afin de mettre en évidence d'éventuelles protéines suppresseur de silencing.

Mots clés : floraison, Gibbérellines, VvFT, VFL, qRT-PCR, silencing, GFP, RDR6, northern blot Race PCR.

Liste des publications et poster :

Publication en préparation pour BMC Plant Biology:

Effect of gibberellins and VvFT on the development of latent bud, tendrils and inflorescences in grapevine.

Marjorie Romon¹, Duyen Prodhomme², Mireille Perrin¹, Carine Schmitt¹, Isabelle Soustre-Gacougnolle³, Claude Gertz¹, Romain Fouquet², Serge Delrot², Jean E. Masson¹

Publication soumise en juin 2013 dans Nature Biotechnologie:

RNA silencing is resistant to low-temperature in grapevine

Marjorie Romon¹, Isabelle Soustre-Gacougnolle³, Carine Schmitt¹, Mireille Perrin¹, Yannick Burdloff¹, Elodie Chevalier¹, Jérôme Mutterer⁴, Christophe Himber⁴, Jérôme Zervudacki⁴, Thomas Montavon⁴, Aude Zimmermann⁴, Taline Elmayan⁵, Hervé Vaucheret⁵, Patrice Dunoyer⁴, Jean E. Masson¹.

Poster :

Uncovering gene silencing mechanisms in grapevine and their response to abiotic stress.

Marjorie Romon¹, Claude Gertz¹, Mireille Perrin¹, Jérôme Zervudacki⁴, Patrice Dunoyer⁴, Jean E. Masson¹.

Ce poster a été présenté lors des Conférences Jacques Monod 2011.

1 : INRA de Colmar, UMR1131 SVQV, 28 rue de Herrlisheim, BP 20507, 68021 Colmar Cedex.

2 : Université Bordeaux, ISVV, Ecophysiologie et Génomique Fonctionnelle de la Vigne, UMR 1287, 33140 Villenave d'Ornon.

3 : Université de Haute Alsace, laboratoire Vigne, Biotechnologies et Environnement (EA 3991), 33 rue de Herrlisheim, 68000 Colmar.

4 : Institut de Biologie Moléculaire des Plantes du CNRS, UPR2357, Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg.

5 : Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR 1318 INRA-AgroParisTech, Route de St-Cyr, 78026 Versailles Cedex, France