DOCTORAT ECOLOGIE BRETAGNE GEOSCIENCES LOIRE AGRONOMIE ALIMENTATION

université angers

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE D'ANGERS

ECOLE DOCTORALE N° 600
Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation
Spécialité : Physiologie végétale

Par
Julie MALLET

Régulations post-transcriptionnelles par les miARNs du débourrement des bourgeons et de son photo-contrôle chez le rosier buisson *Rosa* 'Radrazz'

Thèse présentée et soutenue à Angers, le 30 Mai 2022
Unité de recherche : UMR 1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences
Thèse N° :

Rapporteurs avant soutenance :

Catherine Rameau	Directeur de recherche, UMR 1318 Institut Jean-Pierre Bourgin
Stephanie Jaubert-Possamai	Chargé de Recherche, UMR Institut Sophia Agrobiotech

Composition du Jury :

Président :	Prénom Nom	Fonction et établissement d'exercice (9)*(à préciser après la soutenance)*
Examinateurs :	Anis Limami	Professeur, UMR 1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences
	Thomas Blein	Chargé de Recherche, Institut de Sciences des Plantes – Paris Saclay (IPS2)

Dir. de thèse :	Nathalie Leduc	Professeur, UMR 1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences
Encadrant :	José Le Gourrierec-Gentilhomme	Maitre de conférences, UMR 1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences
Encadrant :	Patrick Laufs	Directeur de recherche, UMR 1318 Institut Jean-Pierre Bourgin

Invité(s)

Sébastien Aubourg	Directeur de recherche, UMR 1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences

Remerciements

Après ces trois années et demie riches en émotion, c'est une page qui se tourne et il est temps de remercier toutes les personnes qui ont contribuées à ma thèse.

Tout d'abord, je tiens à remercier ma directrice de thèse Nathalie Leduc pour ses conseils et sa rigueur, qui m'ont poussé à aller toujours plus loin lors de cette thèse.

Je remercie ma co-encadrante José Le Gourrierec-Gentilhomme pour ses encouragements Merci de ta gentillesse et ta disponibilité tout au long de cette thèse ainsi que de tes conseils lors de l'interprétation des résultats et dans l'élaboration des expériences.

Je tiens à vous remercier Nathalie et José pour votre accompagnement et votre bienveillance lors de la transition de l'équipe ARCH'E vers les deux nouvelles équipes.

Un grand merci à mon co-encadrant Patrick Laufs. Je te remercie d'avoir répondu présent lors de toutes nos visio régulière, tu as été de grand conseil. Je te remercie également pour avoir assuré la transformation des Arabidopsis et le suivi des premières générations ainsi que pour ton accueil lors de notre déplacement à Versailles.

Je remercie également Sébastien Aubourg pour ton implication dans cette thèse, merci pour tes conseils pour les analyses bio-informatiques.

Merci aux membres de mon jury de thèse : Catherine Rameau et Stéphanie Jaubert-Possamai, merci d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon manuscrit de thèse, ainsi que Thomas Blein et Anis Limami, merci d'avoir accepté d'être examinateur.

Je remercie les membres de mon comité de suivi de thèse (CSI) : Thomas Blein et Philippe Gallusci. Merci pour tous vos précieux conseils et votre accompagnement.

Je remercie mes deux familles scientifiques : les membres des équipes STRAGENE et STREMHO. Etre dans ces deux équipes c'était deux fois plus de sourires, d'échanges scientifiques, de soutien moral et de partage de bons moments. J'ai été ravie d'avoir travaillé au sein des deux équipes. Je remercie fortement Nathalie Brouard et Anita Lebrec pour leur aide dans les prélèvements de bourgeon et expériences de biologie moléculaire. Un grand merci à Loly également pour tous nos bons moments et échanges dans le laboratoire de biologie moléculaire

Un grand merci également à Daniel Sochard et Christine Boursin ainsi que les membres de l'équipe PHENOTIC dans la préparation et le suivi des plantes en serre.

Je remercie Alain Vian pour m'avoir encouragé à m'investir au sein de l'école doctorale EGAAL en tant que membre de la commission thèse et représentante des doctorants sur le site Angevin.

Je remercie Sandrine Travier et José Le Gourrierec-Gentilhomme pour m'avoir accompagné dans mes deux années de monitorat à l'Université. J'ai apprécié donner des TP d'Ecologie Végétale (que ce soit en distanciel ou présentiel), c'était très enrichissant et j'en garderai un très bon souvenir.

Merci aux collègues du R+1 pour tous les échanges dans les couloirs et lors des pauses midi (quand c'était possible !).

Je remercie également tous mes camarades de bureau : Ming, Anne, Léa, Thomas, Clovis.

Une pensée spéciale pour toi Béra, on se sera soutenue pendant une bonne partie de nos thèses respectives et on aura bien rigolé. Je te souhaite le meilleur pour la suite de ton parcours.

Un énorme remerciement à Alexis Porcher également. Tu as été d'un grand soutien. Tu as toujours répondu présent lors de mes nombreuses demandes de protocoles, script ou autres... Merci beaucoup pour tes conseils et nos nombreux échanges.

Un grand merci à l'équipe BCR de l'IJPB à Versailles, merci de votre accompagnement pendant mon stage de Master 2 qui m'a permis de mettre un pied dans le monde des miARNs et merci pour votre soutien et conseils lors des concours.

Une pensée pour les camarades du potager : Aurélien, Diana, Brendan, Myriam, Anaïs, Loïc, Julien et Thomas. Merci pour ces moments et nos super récoltes !

Et enfin, un énorme remerciement à mes amis et famille. Merci à Coline, Claire, Léa, Badie, Juliette et tous les autres pour vos messages réguliers, votre soutien et nos bons moments. Merci à ma famille, mes parents, mes grands-parents, Elsa, Louis et Gaspard, merci pour votre soutien à tous les niveaux et merci pour vos hochements de tête quand je vous explique ce que je fais et que vous ne comprenez pas grand-chose. Et le meilleur pour la fin, merci à toi Alan. Merci de m'avoir suivi jusqu'à Angers dans cette folle aventure ! On aura tout vécu pendant ces trois années. Merci pour tout, tout simplement.

Liste des Figures et des Tableaux

Figure 1 : Modèles architecturaux selon Oldeman (1974) 4
Figure 2 : Représentation de l'architecture d'une plante....5
Figure 3 : Organisation structurale du méristème apical caulinaire (MAC)....7
Figure 4 : Coupe longitudinale d'un bourgeon axillaire de rosier *Rosa* 'Radrazz'....7
Figure 5 : Différentes étapes du débourrement d'un bourgeon soumis à de la dominance apicale....8
Figure 6 : Signaux environnementaux et saisons associés aux trois types de dormances des bourgeons de plantes pérennes et de tubercules en zone tempérée....9
Figure 7 : Synthèse et signalisation de l'auxine....11
Figure 8 : Modèles d'action de l'auxine sur le débourrement....12
Figure 9 : Principaux acteurs de la voie de synthèse et de signalisation des strigolactones....13
Figure 10 : Réseau de régulation des principaux acteurs du contrôle du débourrement chez le rosier *Rosa* 'Radrazz'....15
Figure 11 : Représentation du rôle du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans le contrôle du débourrement....17
Figure 12 : Débourrement des bourgeons axillaires de rosier (*Rosa hybrida*), peuplier (*Populus tremula x Populus tremuloïdes*), tomate (*Solanum lycopersicum*), et d'*Arabidopsis thaliana* après 12 jours de culture soit sous lumière blanche, soit à l'obscurité....20
Figure 13 : Distribution des familles de miARNs au travers de la phylogénie des plantes terrestres....23
Figure 14 : Biogenèse et modes d'action des miARNs chez les plantes....24
Figure 15 : Représentation schématique de la démarche suivie pour répondre aux objectifs de thèse et des quatre chapitres de thèse....32
Figure 16 : Parc des pieds mères de *Rosa* 'Radrazz' et Boutures de rosiers placées sous tunnel d'enracinement....34
Figure 17 : Plante de *Rosa* 'Radrazz' au stade bouton floral visible....34
Figure 18 : Spectre lumineux mesuré dans la chambre de culture à l'aide d'un spectroradiomètre Rainbow-light, MR-16....35
Figure 19 : Observation du débourrement ou non du bourgeon distal de *Rosa* 'Radrazz' après décapitation et culture à la lumière ou à l'obscurité....35
Figure 20 : Rosiers sous sac transparent (à gauche) ou sous sac obscure (droite)....36
Figure 21 : Suivi de la température (A) et de l'hygrométrie (B) sous des sachets transparents ou opaque pendant 96h en chambre environnementale....36
Figure 22 : Plan d'expériences et prélèvements des bourgeons sur rosier cultivés en chambre de culture....36
Figure 23 : Carte du vecteur de clonage pENTR/D-TOPO (ThermoFisher)....37
Figure 24 : Carte du vecteur de clonage pMDC32....38
Figure 25 : Bourgeon vu sous une loupe binoculaire....39
Figure 26 : Schéma représentant la dénomination des différents axes et organes pour l'analyse phénotypique. 40
Figure 27 : Nombre de gènes différentiellement exprimés dans les bourgeons 6h après décapitation et selon les conditions d'éclairement....49

Figure 28 : Diagramme de Venn représentant le nombre de gènes différentiellement exprimés dans les bourgeons 6h après décapitation et selon les conditions d'éclairement.....50
Figure 29 : Diagramme de Venn représentant les gènes surexprimés ou réprimés dans les bourgeons entre le moment de la décapitation (t0) et après 6 heures d'exposition à la lumière ou l'obscurité.....51
Figure 30 : Diagramme de Venn représentant les gènes surexprimés ou réprimés au temps t6 à l'obscurité par rapport à la lumière.....52
Figure 31 : Analyse des termes GO des 2431 gènes ayant un changement d'expression indépendant de la condition d'éclairement 6 heures après décapitation.....53
Figure 32 : Variation de l'expression des gènes codants des facteurs de transcription présentant un différentiel d'expression comparé à t0 indépendamment de la condition lumière ou obscurité à un temps précoce du débourrement suite à la décapitation.....54
Figure 33 : Régulation de la photomorphogenèse par HY5 au travers de diverses voies hormonales.....55
Figure 34 : Nombre de gènes significativement induits ou réprimés 6 heures après décapitation indépendamment de la condition d'éclairement, impliqués dans les voies métaboliques et hormonales définies selon la base KEGG.....56
Figure 35 : Analyse détaillée des 1746 gènes différentiellement exprimés dans les bourgeons 3 de plantes cultivées 6 heures à l'obscurité après décapitation versus 6 heures après décapitation à la lumière.....59
Figure 36 : Nombre de gènes différentiellement exprimés à l'obscurité comparé à la condition lumière impliqués dans les voies métaboliques définies selon KEGG.....60
Figure 37 : Gènes impliqués dans la signalisation hormonale différentiellement exprimés à l'obscurité (t6D) par rapport à la condition lumière (t6L).....61
Figure 38 : Variation de l'expression des gènes DE à l'obscurité par rapport à la condition lumière, associés à la transduction du signal de différentes hormones.....62
Figure 39 : Gènes impliqués dans la biosynthèse des flavonoïdes différentiellement exprimés à l'obscurité (t6D) par rapport à la condition lumière (t6L).....63
Figure 40 : Variation de l'expression des gènes DE à l'obscurité (t6D) par rapport à la condition lumière (t6L), associés à la biosynthèse des flavonoïdes.....64
Figure 41 : Analyse des termes GO des 1253 gènes différentiellement exprimés dans les bourgeons 3 de plantes cultivées 6 heures à la lumière après décapitation (t6L) comparé au moment juste après décapitation (t0).....65
Figure 42 : Analyse des termes GO des 3246 gènes différentiellement exprimés dans les bourgeons 3 de plantes cultivées 6 heures à l'obscurité (t6D) après décapitation comparé au moment juste après décapitation (t0).....65
Figure 43 : Nombre de gènes différentiellement exprimés strictement à la lumière ou strictement à l'obscurité uniquement par rapport au moment juste après décapitation (t0) impliqués dans les voies métaboliques définies selon KEGG.....66
Figure 44 : Gènes impliqués dans la signalisation des hormones significativement différentiellement exprimés à la lumière, 6 heures après décapitation (t6L) par rapport à t0.....66

Figure 45 : Gènes impliqués dans la signalisation des hormones significativement différentiellement exprimés à l'obscurité, 6 heures après décapitation (t6D) par rapport à t0.....66
Figure 46 : Variation de l'expression des gènes différentiellement exprimés à la lumière ou à l'obscurité, associés à la transduction du signal de différentes hormones, au cours des phénomènes précoces du débourrement après décapitation.....67
Figure 47 : Gènes impliqué dans le métabolisme de l'amidon et du saccharose significativement différentiellement exprimés à la lumière.....68
Figure 48 : Gènes impliqué dans le métabolisme de l'amidon et du saccharose significativement différentiellement exprimés à l'obscurité.....69
Figure 49 : Evolution de l'expression des gènes différentiellement exprimés à la lumière, associés au métabolisme du saccharose et de l'amidon, au cours des phénomènes précoces du débourrement après décapitation.....70
Figure 50 : Synthèse du tréhalose-6-phosphate et du tréhalose.....70
Figure 51 : Variation de l'expression des gènes différentiellement exprimés à l'obscurité, associés au métabolisme du saccharose et de l'amidon, au cours des phases initiales du débourrement après décapitation.....71
Figure 52 : Gènes différentiellement exprimés à l'obscurité par rapport à t0 impliqués dans le métabolisme des flavonoïdes.....72
Figure 53 : Evolution de l'expression des gènes différentiellement exprimés à l'obscurité, associés à la biosynthèse des flavonoïdes, au cours des phénomènes précoces du débourrement après décapitation.....73
Figure 54 : Evolution de l'expression des gènes différentiellement exprimés à la lumière caractérisés dans le contrôle du débourrement chez le Rosier, au cours des phénomènes précoces du débourrement après décapitation.....74
Figure 55 : Bilan des différents acteurs différentiellement exprimés 6 heures après décapitation à la lumière ou à l'obscurité dans le bourgeon selon nos résultats de séquençage.....74
Figure 56 : Synthèse de la démarche suivie dans le chapitre 2.....74
Figure 57 : Réseau de régulations du débourrement chez le rosier Rosa 'Radrazz'* incluant les couples miARNs/gènes cibles conservés identifiés dans les bourgeons de rosier.....77
Figure 58 : Potentiels rôles des miARNs dans le contrôle du débourrement et leur photo-régulation chez les plantes.....80
Figure 59 : Structure de la famille multigénique des expansines.....81
Figure 60 : Alignement du miR156j_1 avec son potentiel site de reconnaissance sur la séquence de RhEXPA3 et comparaison avec la séquence nucléotidique du gène orthologue chez Arabidopsis AthEXPA15.....82
Figure 61 : Alignement de la séquence du miR164a_4 mature avec son potentiel site de reconnaissance sur la séquence de RhAPX1 et comparaison avec la séquence nucléotidique du gène orthologue chez Arabidopsis AthAPX1.....83
Figure 62 : Répartition des tailles des petits ARNs dans les 9 échantillons séquencés.....85

Figure 63 : Nombre de petits ARNs différentiellement exprimés (DE) dans les bourgeons en fonction des conditions de lumière, 6h après décapitation.....86
Figure 64 : Variation de l'expression des miARNs différentiellement exprimés au cours des phases précoces du débourrement (0 et 6h après décapitation) et en fonction des conditions de lumière selon nos résultats de séquençage.....88
Figure 65 : Analyse de l'accumulation par qPCR des miARNs matures, identifiés comme différentiellement exprimés dans le séquençage des petits ARNs, sur les ARN provenant des échantillons utilisés pour le séquençage.....90
Figure 66 : Alignement des séquences de miARNs matures appartenant aux familles des miARNs identifiés comme différentiellement exprimés avec les séquences des amorces sens dessinées spécifiquement sur ces miARNs différentiellement exprimés.....91
Figure 67 : Variation de l'expression de familles de miARNs identifiés comme différentiellement exprimés dans le séquençage des petits ARNs, au cours du débourrement après décapitation.....92
Figure 68 : Variation de l'expression de la famille miR319 ainsi que de ses potentiels gènes cibles, au cours du processus de débourrement après décapitation.....96
Figure 69 : Variation de l'expression des GRFs potentiellement ciblés par la famille miR396 chez le rosier, au cours du processus de débourrement après décapitation.....97
Figure 70 : Variation de l'expression de la famille miR396 ainsi que ses potentiels gènes cibles, au cours du processus de débourrement après décapitation.....98
Figure 71 : Potentiels rôles des miARNs dans le contrôle du débourrement selon nos résultats de séquençage chez le rosier.....99
Figure 72 : Accumulation de transcrits des constructions pre-miR319a_1_1, pre-miR319a_1_2, pre-miR319b_1 et pre-miR396a-5p dans les lignées transgéniques d'Arabidopsis.....104
Figure 73 : Lignées transgéniques d'Arabidopsis portant les séquences des pre-miARN de rosier sous contrôle du promoteur 35S (35S::319a_1_1/A1, 35S::319a_1_1/C4, 35S::319a_1_2/E1, 35S::319a_1_2/G1, 35S::319b_1/D5, 35S::319b_1/F5), et lignées d'Arabidopsis jawD, SOJ8 et sauvage Col0 prises le jour de la montaison.....105
Figure 74 : Lignées transgéniques d'Arabidopsis portant les séquences des pre-miARN de rosier sous contrôle du promoteur 35S (35S::396a-5p/B2, 35S::396a-5p/E6 et 35S::396a-5p/F2), et lignées d'Arabidopsis rGRF2, MIM396, 35S396b et la lignée sauvage Col0, prises le jour de leur montaison.....106
Figure 75 : Phénotypes des différentes lignées transgéniques surexprimant les pre-miR319 de Rosa 'Radrazz' et d'Arabidopsis (jawD) et d'un mutant gène cible résistant au miR319 chez Arabidopsis (soj8).....107
Figure 76 : Phénotypes des différentes lignées transgéniques surexprimant les pre-miR396 de Rosa 'Radrazz' et d'Arabidopsis (35S396b), d'un mutant gène cible résistant au miR396 (rGRF2) et d'un mutant d'inactivation du miR396 chez Arabidopsis (MIM396).....108
Figure 77 : Variation de l'expression des 5 gènes AthTCPs pouvant être ciblés par la famille miR319 chez les différentes lignées d'Arabidopsis étudiées.....110
Figure 78 : Structure de la famille multigénique TCPs.....112

Figure 79 : Variation de l'expression des 7 AthGRFs cibles potentielles des miR396 chez les différentes lignées d'Arabidopsis étudiées....113
Figure 80 : Modèle de régulation du débourrement du bourgeon par les miR319 et miR396....114
Figure 81 : Modèle de régulation du débourrement par les miARNs et de son photo-contrôle chez le rosier....118

Tableau I : Principales familles de miARNs conservés et leur gènes cibles impliqués dans une modulation de la ramification....26
Tableau II : Test d'enrichissement des gènes entre deux comparaisons des conditions utilisées pour le séquençage....52
Tableau III : Test d'appauvrissement des gènes entre deux comparaisons des conditions utilisées pour le séquençage....52
Tableau IV : Variation de l'expression, termes GO et voies métaboliques associées des gènes ayant un profil d'expression inverse dans les bourgeons de plantes cultivées à la lumière ou à l'obscurité, 6 heures après décapitation par rapport au moment après décapitation....57
Tableau V : Principaux gènes impliqués dans le contrôle du débourrement et son photo-contrôle chez Rosa....73
Tableau VI : MiARNs conservés exprimés dans le bourgeon de Rosa 'Radrazz' et leurs gènes cibles prédits....76
Tableau VII : Principaux gènes impliqués dans le contrôle du débourrement et son photo-contrôle chez Rosa et leurs miARNs associés prédits après analyse psRNATarget....78
Tableau VIII : Nombre de siARNs et de miARNs identifiés par séquençage haut-débit des petits ARNs dans les bourgeons immédiatement après décapitation de la tige (t0) et 6h plus tard sous lumière (t6L) ou obscurité (t6D)....87
Tableau IX : Principaux gènes cibles homologues intéressants sur le génome de Rosa chinensis par analyse PsRNA Target des miARNs Rosa 'Radrazz' différentiellement exprimés dans le séquençage des petits ARNs....93
Tableau X : Coefficient de corrélation du nombre de lectures du miARN et de son potentiel gène cible au moment de la décapitation (t0) et 6 heures après décapitation à la lumière (t6L) ou à l'obscurité (t6D)....95
Tableau XI : Récapitulatif des pre-miARNs et miARNs matures étudiés....103
Tableau XII : Nombre de TCPs cibles potentielles de la famille miR319 chez différentes espèces....111

Abréviations

- µg : microgramme
- µl : microlitre
- ABA : Acide Abscissique
- ADN : Acide Désoxyribo Nucléique
- ADNc : ADN complémentaire
- ARN : Acide Ribo Nucléique
- ARNm : ARN messager
- BFV : Bouton floral visible
- BGI : Beijing Genomics Institute
- BR : Brassinostéroïdes
- CK : Cytokinines
- DE : Différentiellement exprimé
- FT : Facteur de transcription
- GA : Gibbérellines
- GO : Gene Ontology
- KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
- mg : milligramme
- miARN : microARN
- min : minute
- ml : millilitre
- mm : millimètre
- Pb : Paire de bases
- PCR : polymerase chain reaction
- pre-miARN : précurseur de microARN
- pri-miARN : précurseur primaire de microARN
- ROS : Reactive Oxygen Species (Espèce réactive de l'oxygène)
- RPM : rotations par minute
- siARN : small interfering RNA (petit ARN interférent)
- SL : strigolactones
- UTR : Région non traduite (untranslated region)

Table des matières

Contexte de la thèse 1

Introduction - Etude bibliographique 3

1. L'architecture des plantes 4

1.1. Définition 4

1.2. L'architecture influence la qualité visuelle de la plante, sa qualité sanitaire et son rendement 5

1.2.1. L'architecture influence le rendement de la plante 5

1.2.2. L'architecture influence la qualité sanitaire et la prédation 5

1.2.3. La qualité visuelle est liée à l'architecture 6

1.2.4. L'avantage du rosier *Rosa* 'Radrazz', notre modèle d'étude 6

2. Le débourrement est un processus complexe, qui initie la mise en place de l'architecture 7

2.1. Les bourgeons 7

2.1.1. Initiation des bourgeons 7

2.1.2. Les dormances 8

2.1.3. Levée des dormances 9

2.1.4. Reprise de la croissance 10

3. Le débourrement résulte de l'intégration des effets de nombreux facteurs 11

3.1. Implication de facteurs endogènes 11

3.1.1. Implication des hormones : L'auxine (IAA) 11

3.1.2. Les cytokinines (CK) 12

3.1.3. Les strigolactones (SL) 13

3.1.4. L'acide abscissique (ABA) 14

3.1.5. Les gibbérellines (GA) 14

3.1.6. Les brassinostéroïdes (BR) 15

3.1.7. L'éthylène 15

3.1.8. Rôle intégrateur de BRC1 15

3.2. Implication du métabolisme primaire 16

3.3. Métabolisme oxydatif et contrôle du débourrement 17

3.4. La lumière : facteur environnemental majeur dans le contrôle du débourrement 18

3.4.1. Effet de la qualité de la lumière 18

3.4.2. Effet de la quantité de lumière 20

3.4.3. Régulation par la lumière des acteurs principaux du contrôle du débourrement 20

4. Régulations post-transcriptionnelles dans le contrôle du débourrement 22

4.1. Mécanisme général de l'action des petits ARNs 23

4.2. Les miARNs 23
4.2.1. Biogenèse des miARNs 24
4.2.2. Mécanisme d'action des miARNs et conséquences sur le développement des plantes 24
4.3. MiARNs conservés et régulation du débourrement 26
4.4. Interactions entre lumière et expression des gènes codant des miARNs 29
5. Problématique et objectifs de la thèse 31

Matériel et Méthodes 33

1. Matériel végétal et culture des plantes 34
1.1. Multiplication végétative et culture en serre des rosiers 34
1.2. Culture des rosiers en conditions contrôlées 34
1.3. Culture d'*Arabidopsis thaliana* 35
2. Modèle d'étude sur plantes décapitées 35
2.1. Levée de la dominance apicale par décapitation 35
2.2. Études sur un bourgeon médian 35
2.3. Traitements lumineux des plantes décapitées 36
2.4. Validation des conditions de culture en terme de température et hygrométrie sous les sachets 36
2.5. Cinétique et prélèvements d'échantillons 36
3. Constructions moléculaires 37
3.1. pENTR 37
3.2. pMDC32 37
4. Clonage de type Gateway 37
4.1. Souches bactériennes 37
4.1.1. Escherichia coli 37
4.1.2. Agrobacterium tumefaciens 37
4.1.3. Transformation des E. coli 38
4.1.4. Transformation d'*Agrobacterium tumefaciens* 38
5. Obtention de plantes transgéniques d'*Arabidopsis* 39
6. Analyses phénotypiques 39
6.1. Suivi de l'élongation du bourgeon et comptage du nombre de pièces foliaires 39
6.2. Analyse phénotypique des mutants d'*Arabidopsis* 40
7. Analyses de biologie moléculaire 40
7.1. Analyse de l'accumulation des transcrits de gènes d'intérêt 40
7.1.1. Extractions des ARNs totaux à partir de matériel végétal 40
7.1.2. Synthèse des ADN complémentaires (ADNc) 41
7.1.3. Transcription réverse des miARNs 41
7.1.4. Conception des amorces pour l'amplification par qPCR de gènes d'intérêt 41

7.1.5. Mesure de l'accumulation des transcrits par PCR quantitative (qPCR) en temps réel 42
8. Analyses transcriptomiques à haut débit (ARNm et petits ARNs) 42
8.1. Séquençage à haut débit par la technologie Illumina des ARNm 42
8.2. Séquençage à haut débit par la technologie Illumina des petits ARNs 43
9. Analyses bio-informatiques du séquençage des ARNm 43
9.1. Qualité des lectures (reads) 43
9.2. Alignement des reads contre un génome de référence 43
9.3. Comptage des reads 43
9.4. Analyse d'expression différentielle 44
9.5. Enrichissement des voies (GO et KEGG) 44
10. Analyses bio-informatiques du séquençage des petits ARNs 45
10.1. Nettoyage des données 45
10.2. Alignement des lectures, réalisé par la société BGI 45
10.3. Prédiction des petits ARNs, réalisé par la société BGI 45
10.4. Analyse d'expression, ... 45
10.5. Prédiction des cibles 46
11. Analyses statistiques 46
Résultats 47
Chapitre I : Etude du transcriptome des phases précoces du débourrement en réponse à la lumière 48
1. Introduction 48
2. Résultats 49
2.1. Analyse d'expression différentielle 49
2.2. Fonctions des gènes impliqués dans la réponse indépendante aux conditions d'éclairement 53
2.3. Groupe de gènes ayant un profil d'expression inverse entre la condition lumière et la condition obscurité 56
2.4. Fonction des gènes sous photo-contrôle au point 6 heures après décapitation. 59
2.5. Fonction des gènes sous photo-contrôle au cours du débourrement 63
2.6. Approche basée sur les données de la littérature : expression des gènes déjà caractérisés par l'équipe dans l'étude du contrôle du débourrement 69
3. Discussion et conclusion 72
Chapitre II : Recherche *in silico* par approche candidate de couples miARN/gène cible impliqués dans le contrôle du débourrement chez le rosier 74
1. Etude des miARNs conservés chez le rosier 74
2. Recherche de nouveaux couples miARN/gène cible dans le contrôle du débourrement chez le rosier 77
3. Discussion et conclusion 82

Chapitre III : Etude du micro-transcriptome à une phase précoce du débourrement en réponse à la lumière 85

1. Introduction 85
2. Résultats 86
   2.1. Distribution des tailles de petits ARNs 86
   2.2. Prédiction des petits ARNs 86
   2.3. Analyse d'expression différentielle des petits ARNs 86
   2.4. Validation des expressions des miARNs par qPCR 90
   2.5. Suivi de l'expression des familles de miARNs au cours du débourrement 91
   2.6. Recherche de gènes cibles 92
3. Discussion et conclusion 98

Chapitre IV : Validation fonctionnelle de deux couples miARN / gène cible de rosier dans le contrôle du débourrement 101

1. Introduction 101
2. Résultats 104
   2.1. Validation de l'accumulation des pre-miARNs chez les lignées transgéniques 104
   2.2. Etude du phénotype des lignées transgéniques *Arabidopsis* 105
   2.3. Suivi de l'expression des gènes cibles chez les lignées *Arabidopsis* 110
3. Discussion et conclusions 113

Conclusion générale 116

Rôle des miARNs dans le contrôle et le photo-contrôle du débourrement chez le rosier . 118

Les miARNs impliqués dans le contrôle du débourrement chez le rosier 119
Les miARNs impliqués dans le photo-contrôle du débourrement. 121
Identification de nouveaux gènes cibles des miARNs différentiellement exprimés. 122

Perspectives 125

Etude du rôle des miARNs candidats dans le contrôle du débourrement par transformation chez le rosier 126

Interactions entre miARNs et facteurs endogènes du contrôle du débourrement. 127

SiARNs et autres petits ARNs sont-ils impliqués dans le contrôle du débourrement ? 128

Les micro-peptides, molécules à fort potentiel dans l'étude du contrôle du débourrement par les miARNs. 129

Intérêts des approches petits ARNs et miPEPs pour des applications agronomiques 130

Bibliographie 132

Annexes 161

Contexte de la thèse

La filière de l'horticulture ornementale française est un secteur important qui permet de générer 18000 emplois équivalents temps plein. Vingt mille entreprises de distribution et de commercialisation, et vingt-neuf mille entreprises du paysage sont associées à ce secteur et permettent de générer un chiffre d'affaires d'environ 1.2 milliards d'euros en 2018, soit 4 % de la valeur des livraisons de l'agriculture française (FranceAgriMer, 2021). C'est l'un des secteurs qui emploie le plus de main d'œuvre en agriculture.

La filière se divise en quatre branches d'activités : les fleurs et feuillages coupés, les plantes en pot et à massif, les végétaux de pépinières et les bulbes à fleurs.

Dans le secteur de l'horticulture ornementale, le rosier tient une place importante en termes de volume et de valeur de ventes avec une production qui se décline aussi bien sous la forme de fleurs coupées, de rosiers de jardin que de potées fleuries d'intérieur ou d'extérieur. En 2018, le rosier fait partie des plantes les plus achetées dans les catégories plantes et fleurs à semer/planter et fleurs coupées (Rapport France Agrimer 2019). Les rosiers extérieurs représentent 17% des dépenses en arbres et arbustes d'ornement en France en 2020, soit 54,1 millions d'euros dépensés dans l'achat de rosier d'extérieur destiné aux jardins et balcons (rapport Val'hor 2020).

La région Pays de la Loire est la première région française en horticulture ornementale dont le chiffre d'affaires en production était de 3 millions d'euros en 2017 (Rapport Val'hor 2017). La région compte près de 320 entreprises horticoles employant environ 2600 salariés permanents. Les Pays de la Loire représentent 94% de la production nationale pour les hortensias et 54% pour les rosiers de jardin dont 45% à Doué-la-Fontaine (49) (ores.paysdelaloire.fr, 2017).

Au vu de l'importance économique du rosier en Pays de la Loire, des chercheurs de l'IRHS (Institut de Recherche Horticole et Semences, UMR 1345 Université d'Angers-INRAE-Institut Agro Rennes-Angers) ont centré leurs efforts de recherche sur l'étude de cette plante. Les projets de recherche qu'ils mènent visent à mieux comprendre le développement du rosier en interaction avec son environnement biotique et abiotique afin de répondre aux attentes et besoins des producteurs et des consommateurs.

Ces attentes concernent l'amélioration des itinéraires de culture pour des productions plus respectueuses de l'environnement, l'augmentation des résistances aux stress abiotiques (température, stress hydrique, ombrage) et aux maladies, ainsi que l'amélioration de caractères ornementaux tels que la floraison (remontée de floraison, parfum) et le port de la plante. C'est sur ce dernier aspect que porte la thèse présentée ici.

Cette thèse a débuté au sein de l'équipe IRHS-ARCH-E (Architecture et Environnement) aujourd'hui scindée en 2 équipes IRHS-STRAGENE (STructure et RAmification en réponse à l'interaction GEnotype et eNvironnEment) et IRHS-STREMHO (Stress, Epigénétique et Mémoire des Plantes Horticoles). Les chercheurs de ces deux équipes étudient le développement architectural des plantes d'ornement en relation avec leur environnement abiotique. Leurs travaux intègrent différentes échelles d'étude : des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués notamment dans la régulation du débourrement des bourgeons à l'analyse écophysiologique de l'élaboration de l'architecture des plantes tout en intégrant des études de modélisation de cette architecture. Ce travail de thèse a été mené en collaboration avec l'IJPB (Institut Jean-Pierre Bourgin, INRAE à Versailles), et le Dr Patrick Laufs, spécialiste du développement des méristèmes et des feuilles chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana.*

Cette thèse s'intègre dans le projet ROSAPEPS et a été réalisée grâce au soutien financier du RFI (Recherche Formation Innovation) Objectif Végétal de la région Pays-de-la-Loire, de l'Université d'Angers et du Ministère de l'enseignement supérieur.

Introduction - Etude bibliographique

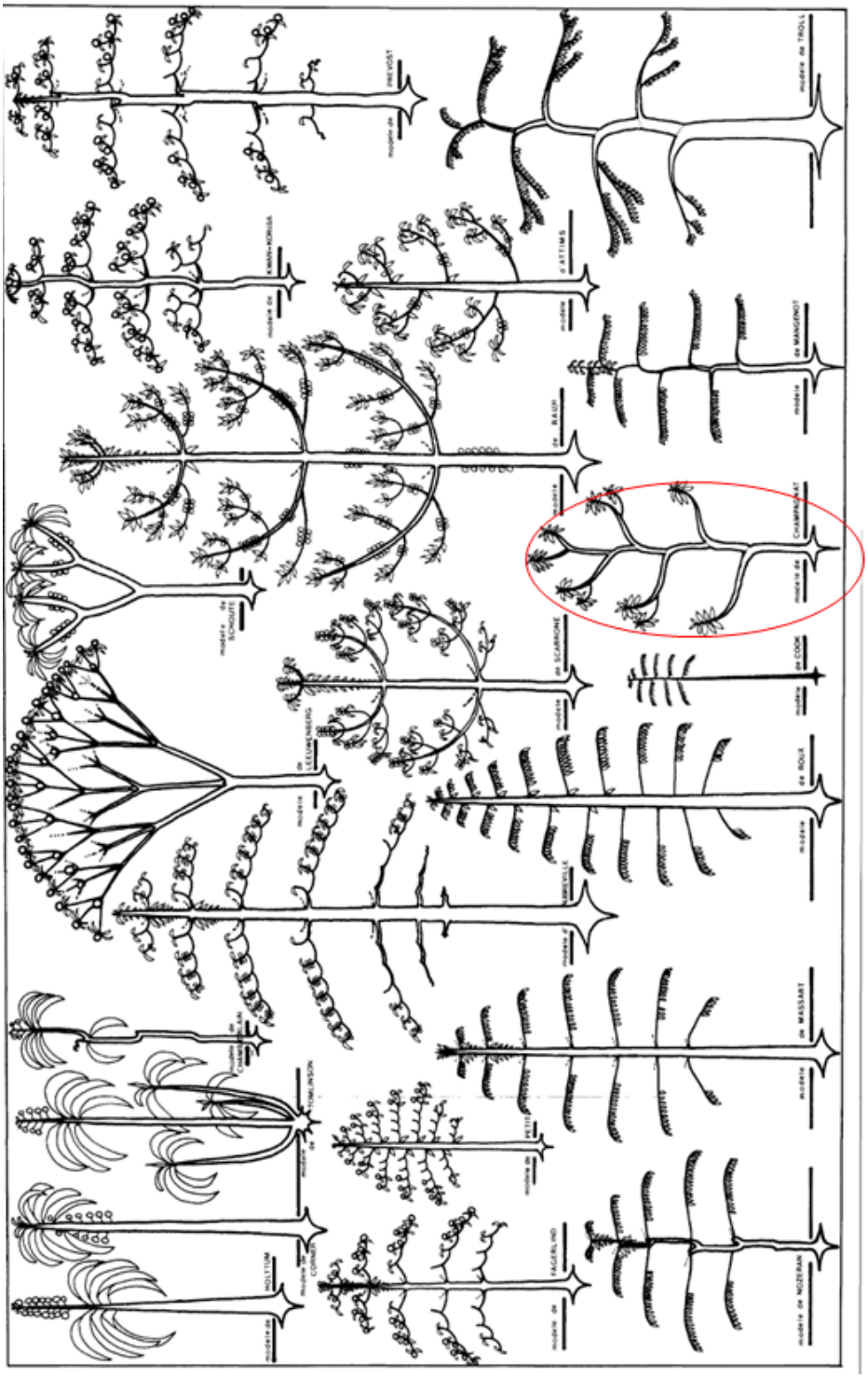

Figure 1 : **Modèles architecturaux selon Oldeman (1974).** En rouge, le modèle architectural du rosier.

1. L'architecture des plantes

1.1. Définition

Les plantes étant immobiles, elles ne peuvent fuir un environnement défavorable à leur développement. Elles doivent donc s'adapter à ces conditions qui peuvent résulter de l'action de facteurs abiotiques (disponibilité en eau, conditions d'éclairement, de température...) ou biotiques (organismes pathogènes, herbivores etc…). La plasticité de l'élaboration de l'architecture des plantes contribue aux stratégies d'adaptation des plantes.

L'architecture d'une plante peut être définie comme "l'ensemble des formes structurales que l'on peut observer à un moment donné chez une plante" (Oldeman, 1974). Concernant la partie aérienne de la plante, cela inclut le type de ramification, tout comme la taille, la forme et la position des feuilles et des organes floraux sur les rameaux (Reinhardt et Kuhlemeier, 2002). Il existe selon Oldeman (1974) 23 principaux modèles architecturaux des plantes (Figure 1). Le rosier, par exemple, appartient au modèle de Champagnat. Il caractérise des plantes formées d'axes orthotropes qui s'affaissent dans leur partie distale. Les relais de croissance apparaissent généralement dans la zone de courbure. La partie distale de ces axes forme les branches tandis que la succession des parties proximales peut former un tronc (Figure 1).

L'établissement de l'architecture d'une plante commence dès la germination de la graine et continue jusqu'à la mise en place de l'appareil végétatif puis reproducteur (Hallé et Oldeman, 1970). Pendant l'embryogenèse, l'axe apical-basal de la future plante est établi. A chaque extrémité de cet axe, les méristèmes apicaux (caulinaire ou racinaire) MAC et MAR se forment. Après la germination, le MAC élabore la partie aérienne de la plante et assure sa croissance primaire. Pour cela, il produit une succession de phytomères qui s'empilent formant ainsi la tige. Chaque phytomère est constitué d'un entre-nœud et d'un nœud associé à une ou plusieurs feuilles. A l'aisselle de ces feuilles se forment un ou des méristèmes axillaires qui produiront après débourrement des axes secondaires, permettant la formation d'architectures plus ou moins complexes (Figure 2). L'architecture d'une plante est donc déterminée par le nombre, la position et l'activité de ses méristèmes axillaires et de leur capacité à se développer (Hallé et Oldeman, 1970 ; Teichmann et Muhr, 2015). Dans des conditions écologiques favorables, l'architecture est conditionnée principalement par son patrimoine génétique. Sous stress, elle peut être également conditionnée par des contraintes environnementales (Hallé et Oldeman, 1970 ; Li-Marchetti et al., 2015 ; Crespel et al., 2020).
Par exemple, il a été montré qu'une restriction temporaire en eau suivie d'un retour à une irrigation de confort augmente la ramification en partie médiane chez le rosier (Demotes-Mainard et al., 2013). Également, le nombre d'axes augmente chez des rosiers cultivés sous lumière blanche enrichie en rouge sombre (Crespel et al., 2020).

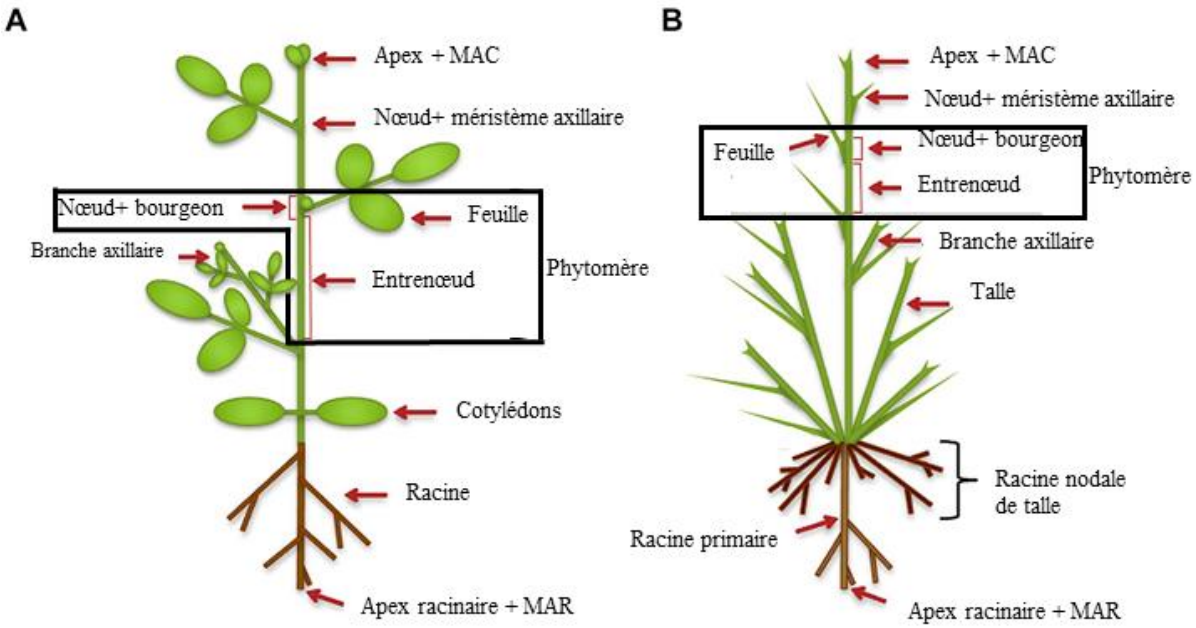

Figure 2 **: Représentation de l'architecture d'une plante.** A : Architecture typique d'une plante dicotylédone. B : Architecture typique d'une plante monocotylédone. Selon Teichman et Muhr (2015).

1.2. L'architecture influence la qualité visuelle de la plante, sa qualité sanitaire et son rendement

1.2.1. L'architecture influence le rendement de la plante

La maîtrise de l'architecture est importante car l'architecture peut influencer le rendement d'une plante. Un exemple remarquable a été observé pendant la révolution verte dans les années 1960/70, que la productivité en grain de blé avait fortement augmenté. Cela s'est expliqué par l'adoption de nouvelles méthodes culturales par les agriculteurs et par la sélection de variétés de blé plus petites, de ce fait, plus résistantes au vent et à la pluie, et donnant de meilleurs rendements en grains. Il a été montré plus tard que le nanisme de ces variétés était dû à une réponse réduite aux gibbérellines (GA), ces plantes présentant une mutation du gène orthologue d'*Arabidopsis GIBBERELIN INSENSITIVE* (GAI) (Peng et al., 1999). Plus globalement, l'architecture détermine le nombre de fleurs, leur position, ce qui va avoir un fort impact sur la gestion de la culture et son rendement. Par exemple, chez la tomate, certaines variétés ont été sélectionnées pour leur floraison précoce, maturation rapide et sont généralement plus compactes, ce qui facilite les récoltes à grande échelle (Benlloch et al., 2015).

1.2.2. L'architecture influence la qualité sanitaire et la prédation

L'architecture peut influencer la sensibilité des plantes face aux maladies. En effet, une plante plutôt compacte peut développer des microclimats en termes d'humidité et température qui peuvent être favorables ou non au développement de certains pathogènes des plantes (Agrios 2005 ; Tivoli et al., 2013). Par exemple, il a été montré que l'élagage sur pommier permet une meilleure aération de la couronne de l'arbre et donc des périodes d'humidité plus courtes au sein de l'arbre, ce qui diminue le risque d'infection par la gale du pommier *Venturia inaequalis* (Tivoli et al., 2013). La hauteur, le nombre de tiges, de feuilles, caractères importants de l'architecture ont un effet sur le comportement des prédateurs herbivores et doivent être pris en compte dans les programmes de contrôle biologique (Gontijo et al., 2012).

1.2.3. La qualité visuelle est liée à l'architecture

La qualité esthétique d'une plante est un critère majeur pour les plantes d'ornement et dépend de plusieurs caractéristiques visuelles comme la forme globale de la plante, sa hauteur et la couleur, le nombre et la disposition des fleurs. La forme de la plante est un des critères principaux chez les consommateurs urbains qui recherchent des plantes compactes pour leurs jardins de dimensions généralement réduites (Boumaza et al., 2009 ; Boumaza et al., 2010). La forme de la plante est conditionnée par la vigueur de la plante ainsi que par sa capacité de ramification. La compréhension et la maîtrise de la mise en place de l'architecture d'une plante peuvent contribuer à mieux répondre aux attentes des consommateurs.

Chez le rosier, les bourgeons axillaires avortés ou l'absence de ramification basale sont des problèmes récurrents en production qui réduisent la qualité commerciale des plantes. Un rosier de jardin de qualité doit ainsi porter au moins cinq branches basales vigoureuses lors de la vente. Moins de branches conduit au déclassement de la plante et à des pertes financières pour le producteur. Ces problèmes de moindre ramification sont favorisés par des conditions environnementales défavorables (faible intensité lumineuse, fluctuations de température). Comprendre l'action de ces facteurs environnementaux sur la ramification afin de mieux maîtriser les itinéraires techniques est donc un enjeu économique important pour les producteurs. Par ailleurs, les techniques horticoles actuelles utilisées pour maîtriser l'architecture des plantes (taille, utilisation de molécules chimiques nanifiantes) sont coûteuses en main d'œuvre et néfastes pour l'environnement. La compréhension des mécanismes qui régissent l'élaboration de l'architecture de la plante peut contribuer à une meilleure maîtrise du développement des plantes en production tout en minimisant les coûts et l'impact environnemental des traitements chimiques en utilisant des itinéraires de cultures alternatifs. Les travaux de l'équipe sur le rosier ainsi que d'autres menés chez d'autres espèces montrent comment le choix de spectres lumineux appropriés peut moduler la croissance des plantes et ainsi produire des plantes plus compactes sans utilisation de nanifiants chimiques.

1.2.4. L'avantage du rosier *Rosa* 'Radrazz', notre modèle d'étude

Le rosier est la plante économiquement la plus importante parmi les plantes d'ornement (54,1 millions d'euros dépensés dans l'achat de rosier d'extérieur destiné aux jardins et balcons en 2020). Il est utilisé pour divers types de produits de commercialisation comme les fleurs coupées, la parfumerie ou les rosiers de jardins. Il est également utilisé pour ses couleurs variées et ses architectures contrastées. Les ports tapissant et buissons sont ainsi utilisés en massifs paysagers, alors que les ports nains sont adoptés souvent pour les plantes en pots sur les terrasses et balcons.

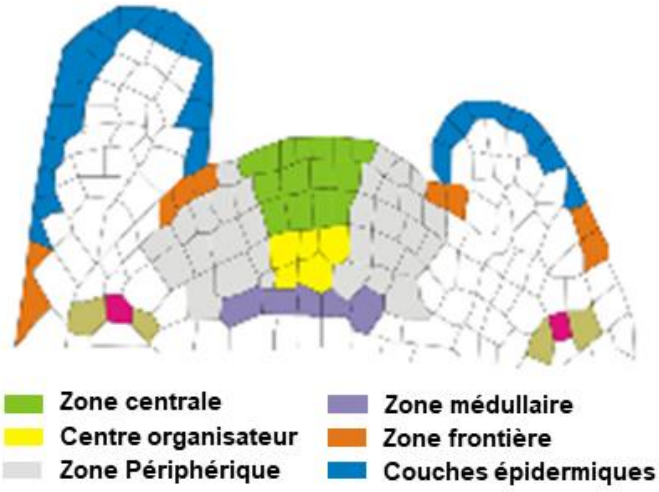

Figure 3 : **Organisation structurale du méristème apical caulinaire (MAC).** Le code couleur représente les différents domaines du MAC. Adapté de Schippers et al. (2016).

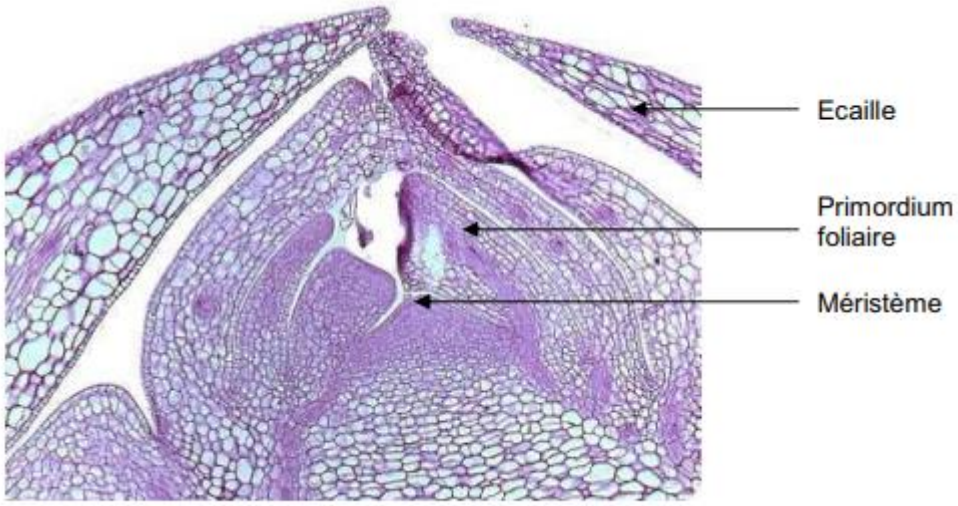

Figure 4 : **Coupe longitudinale d'un bourgeon axillaire de rosier *Rosa* 'Radrazz'.** Selon Girault, 2009.

Le modèle d'étude de l'équipe ARCH'E (devenue les équipes STREMHO et STRAGENE de l'IRHS en 2019) est le rosier *Rosa* 'Radrazz'. Ce rosier est commercialisé par l'entreprise Meilland Richardier. Ce rosier a pour particularité d'avoir une forte résistance aux maladies et il est de ce fait, le premier cultivar de rosier utilisé aux USA pour le fleurissement de massifs. Ce génotype peut être multiplié sans passer par la phase de greffage qui est coûteuse car il s'enracine facilement par bouturage. La multiplication végétative par bouturage d'une plante unique au début des travaux de l'équipe sur ce rosier a permis de former un clone, assurant l'homogénéité génotypique des lots de plantes utilisés dans nos expérimentations. De plus, chez ce rosier, la levée de la dominance apicale qui survient lors de la floraison du bouton floral terminal d'un axe est plus tardive que d'autres cultivars, ce qui maintient les bourgeons axillaires de la tige à l'état dormant plus longtemps, facilitant les études du débourrement des bourgeons.

2. Le débourrement est un processus complexe, qui initie la mise en place de l'architecture

2.1. Les bourgeons

2.1.1. Initiation des bourgeons

Le développement de la partie aérienne de la plante est assuré par le MAC. Le MAC est un groupe de cellules situé à l'apex d'une tige ou au sein des bourgeons axillaires. Le MAC va générer des phytomères, constitués d'un nœud, d'un entre-nœud de la tige, d'une feuille et d'un bourgeon axillaire (Steeves et Sussex, 1989). Lorsque le bourgeon débourre, l'activité organogénétique et histogène du MAC va générer tous les tissus de la tige ainsi que les feuilles et permettre ainsi le développement des axes aériens. Le MAC est composé d'une zone centrale (ZC), située au centre du méristème, composée de cellules souches se divisant lentement et permettant le maintien du méristème. Le MAC comporte aussi une zone périphérique (ZP) contenant des cellules se divisant plus rapidement qui seront intégrées dans les primordia de feuilles et les entre-nœuds (Figure 3). Le MAC est enfin formé d'une zone médullaire (ZM) qui générera le parenchyme médullaire des entre-nœuds de la tige ainsi que le procambium. L'initiation des primordia foliaires dans la zone périphérique nécessite la création d'une zone frontière (ZF) entre les cellules qui resteront au sein du méristème et celles qui formeront le primordium. La ZF est fortement régulée par des facteurs de transcription qui jouent un rôle important dans la répression de la prolifération cellulaire et dans la maintenance de son caractère méristématique (Schmitz et Theres, 2005 ; Bell et al., 2012 ; Wang et al., 2014 ; Zadnikova et Simon, 2014 ; Teichman et Muhr, 2015).

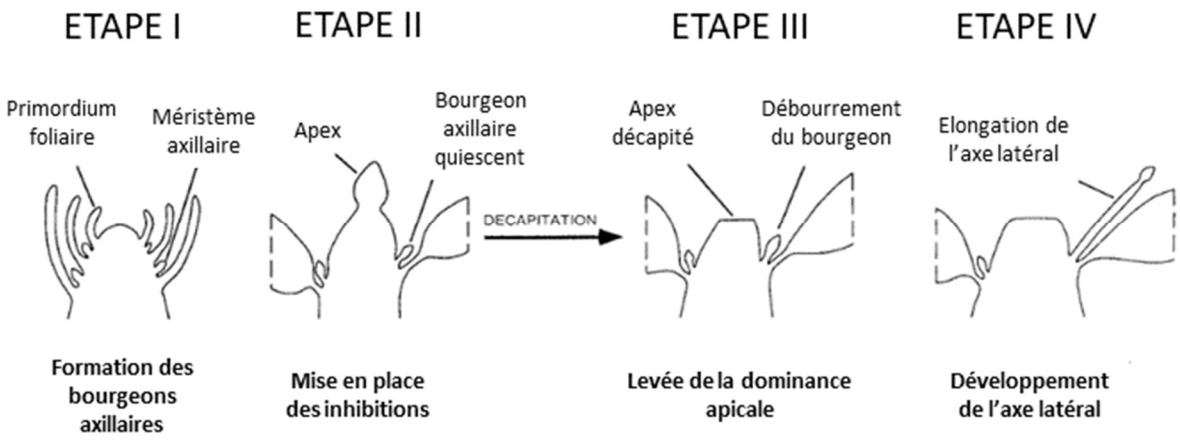

Figure 5 : **Différentes étapes du débourrement d'un bourgeon soumis à de la dominance apicale.** D'après Cline (1997).

Les méristèmes axillaires ne se forment que sur la face adaxiale du primordium foliaire, face qui est contre cette ZF (Bennet et Leyser, 2006). Nous considérons que les méristèmes axillaires sont formés à partir de cellules détachées à partir du MAC.
Des analyses histologiques ont permis de mettre en évidence l'expression de marqueurs méristématiques comme le gène *STM* (*SHOOT MERISTEMLESS*) (Steeves et Sussex, 1989 ; Wang et Jiao, 2018) dans la ZF. L'initiation des méristèmes axillaires est régulée par plusieurs facteurs de transcription comme les gènes *CUC* (*CUP SHAPED COTYLEDON*), *LAS* (*LATERAL SUPPRESSOR), RAX* (*REGULATOR OF AXILLARY MERISTEMS*) et *REV* (*REVOLUTA*) chez *Arabidopsis* (Talbert et al., 1995 ; Aida et al., 1999 ; Greb et al., 2003 ; Keller et al., 2006 ; Spinelli et al., 2011 ; Yang et al., 2016 ; Wang et al., 2016).

A ce modèle de formation des méristèmes axillaires selon le modèle du « méristème détaché » s'oppose l'hypothèse *de novo* qui suggère que les méristèmes axillaires s'initient séparément du MAC après l'organogenèse de la feuille sous-jacente (Snow et Snow, 1942). Selon cette hypothèse, les méristèmes axillaires résultent de la dédifférenciation de cellules différenciées. Les données moléculaires et génétiques actuelles sont plutôt en faveur de la première hypothèse.

Après leur initiation, les méristèmes axillaires peuvent produire un nombre plus ou moins important de phytomères préformés avant de rentrer souvent dans une phase de dormance. Ainsi, dans le cas du rosier, le méristème axillaire dormant contient des phytomères formés de primordia foliaires ou de jeunes feuilles et d'écailles protectrices, et l'ensemble constitue un bourgeon axillaire, organe complexe à l'origine de la ramification des tiges (Girault, 2009 ; Figure 4). Au cours du débourrement, les écailles protectrices s'écartent afin de permettre la sortie des jeunes feuilles préformées. Selon Cline, 1997, la dominance apicale ainsi que sa levée est une succession de quatre étapes : 1- formation du bourgeon axillaire, 2- mise en place éventuelle de dormances (détaillée ci-dessous), 3- levée des dormances du bourgeon axillaire et enfin 4- croissance du bourgeon produisant un axe (Figure 5). Le débourrement est caractérisé par les deux dernières étapes.

2.1.2. Les dormances

Une fois initiés, les bourgeons peuvent soit immédiatement débourrer (bourgeon en croissance immédiate dit bourgeon sylleptique) ou bien entrer en dormance (bourgeon à croissance différée dit bourgeon proleptique) (Sabatier et Barthélemy, 2000). La dormance est définie comme une "suspension temporaire de croissance visible de n'importe quelle structure de la plante portant un méristème" (Lang, 1987). La dormance est complexe et inclut les endo-, para- et éco-dormances qui peuvent parfois se chevaucher dans le temps (Lang, 1987 ; Cline 1997).

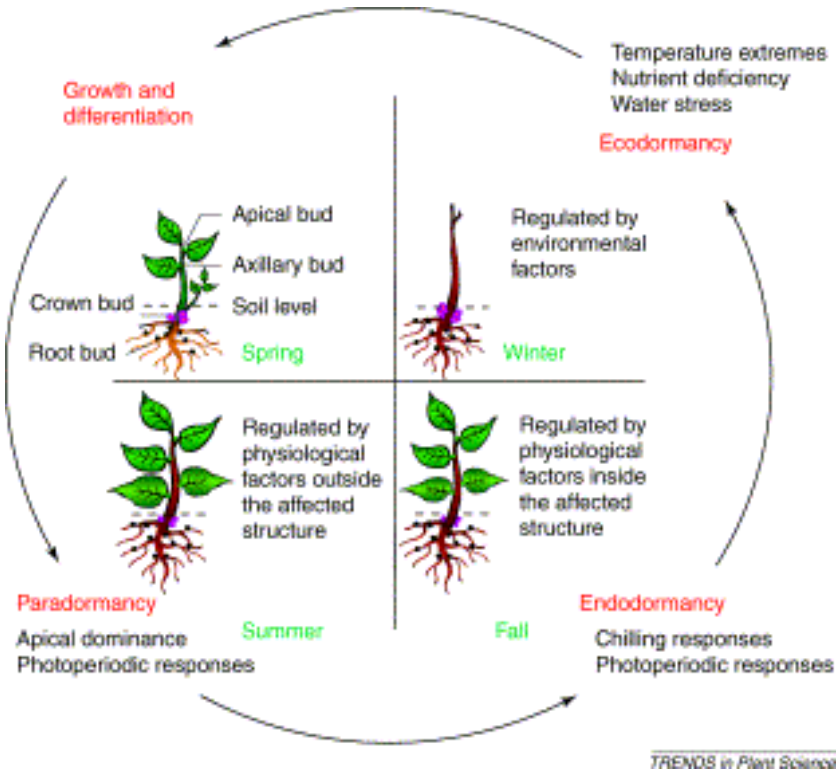

Figure 6 : **Signaux environnementaux et saisons associés aux trois types de dormances des bourgeons de plantes pérennes et de tubercules en zone tempérée**. D'après Horvath et al., 2003.

L'endodormance est contrôlée par des mécanismes endogènes au bourgeon et est fréquemment induite lors de la transition entre la saison estivale et la saison automnale par la diminution des températures et de la photopériode (Chao et al., 2007). Elle est fréquemment levée par l'accumulation de froid reçu par le bourgeon au cours de l'hiver.

Alors que l'endodormance est contrôlée par des mécanismes endogènes au bourgeon, **la paradormance** est imposée par les organes environnants et en croissance (feuilles, entre-nœuds, autres bourgeons). Un exemple particulièrement bien étudié de paradormance est la dominance apicale. Celle-ci entraîne l'inhibition du débourrement des bourgeons axillaires par le méristème le plus distale de la tige en cours de croissance (Thimann et Skoog, 1933).

L'écodormance est une dormance imposée par l'environnement sur le bourgeon et qui bloque son débourrement alors que celui-ci n'est plus soumis ni à une endodormance, ni à une paradormance. Elle est induite lorsque les conditions environnementales sont défavorables au développement des organes (Horvath et al., 2003).

Ces trois types de dormances agissent de façon indépendante mais peuvent s'exercer de manière chevauchante sur le bourgeon (Horvath et al., 2003) (Figure 6). Chez les ligneux comme par exemple le rosier, il est possible d'associer un cycle saisonnier avec les différentes dormances : 1) l'endodormance se met en place à la fin de l'été et dure jusqu'à la fin de l'hiver (sa levée nécessite une longue période de froid). 2) l'écodormance est associée également à l'hiver dû aux températures froides et dure jusqu'au printemps lorsque les températures redeviennent favorables à la croissance. Et enfin, 3) la paradormance est effective pendant l'initiation et la croissance des jeunes organes et a un effet répressif sur le débourrement d'autres bourgeons de l'axe (Horvath et al., 2003).

2.1.3. Levée des dormances

L'endodormance et l'écodormance sont toutes les deux sous le contrôle de l'environnement, il est donc difficile de les distinguer. Il a été montré que les températures et la lumière ont un fort effet sur ces dormances (Cooke et al., 2012). Par exemple, chez de nombreuses espèces ligneuses comme le pommier, une période de froid est nécessaire pour lever l'endodormance des bourgeons et permettre leur débourrement au printemps (Mauget et Rageau, 1987 ; Matsui et al., 2000). Toutefois, le débourrement ne sera possible que lorsque l'écodormance sera levée, c'est-à-dire lorsque les températures du sol et de l'air seront suffisamment hautes au sortir de l'hiver pour accompagner la croissance. Concernant l'effet de la lumière, il a été montré que la photopériode joue un rôle important dans le contrôle des dormances.

En effet, une réduction de la photopériode va entraîner l'induction des dormances chez certaines espèces (Thomas et Vince-Prue, 1996 ; Borchert et Rivera, 2001) alors qu'une photopériode plus longue va permettre la levée de dormance et le débourrement (Heide, 1993). La qualité et l'intensité de la lumière sont aussi des paramètres qui contrôlent l'écodormance et qui peuvent profondément limiter la capacité de débourrement des bourgeons. L'étude de l'impact de la lumière sur la dormance des bourgeons étant centrale dans cette thèse, leurs effets sont détaillés plus loin dans un paragraphe dédié (Partie 3.4.).

Concernant la paradormance, l'exemple le plus étudié de cette dormance est la dominance apicale. Une levée de la dominance apicale peut être déclenché de différentes manières comme le développement du bourgeon floral, décapitation de l'apex ou bien par apport de produits exogènes comme du bromoéthane ou du cyanamide d'hydrogène (Ophir et al., 2009 ; Suttle, 2009 ; Walton et al., 2009).

2.1.4. Reprise de la croissance

Le débourrement d'un bourgeon correspond à une reprise de l'activité d'organogenèse, de l'élongation des entre-nœuds et de l'expansion des organes préformés dans le bourgeon après la levée de dormance (Girault et al., 2008).

Pendant la dormance, les cellules méristématiques du bourgeon sont arrêtées soit en phase G0 comme chez la pomme de terre (Campbell et al., 1996), soit en phase G1 ou bien dans les transitions G1/S ou S/G2 (Devitt et Stafstrom, 1995 ; Horvath et al., 2003). Il a été montré qu'après la levée de la dominance apicale par décapitation, les cellules entrent rapidement en phase S, c'est-à-dire qu'une reprise de la réplication d'ADN a lieu, qui accompagne celle du cycle cellulaire (Shimizu et Mori, 1998 ; Gonzalez-Grandio et al., 2013).

La réactivation du cycle cellulaire entraîne une augmentation de l'activité transcriptionnelle de *PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN* (*PCNA*), un cofacteur des polymérases d'ADN qui encerclent la molécule d'ADN au moment de sa duplication (Moldovan et al., 2007). De même, l'activité de *CELL DIVISION CYCLE 2* (*CDC2*), *CYCLIN B* (*CYCB*, Devitt et Stafstrom, 1995) et de *CYCLIN D3* (*CYCD3*) prend rapidement place chez le pois *Pisum sativum* (Shimizu et Mori, 1998), le pommier (Li et al., 2018) et chez le bourgeon de rosier (Roman et al., 2016 ; Porcher et al., 2020) pendant le débourrement. Ces gènes sont de bons marqueurs de l'initiation du débourrement.

La division cellulaire ainsi que l'expansion de la paroi cellulaire contribuent à la croissance des primordia d'organes et conduisent à l'émergence de jeunes feuilles en dehors des écailles de bourgeon.

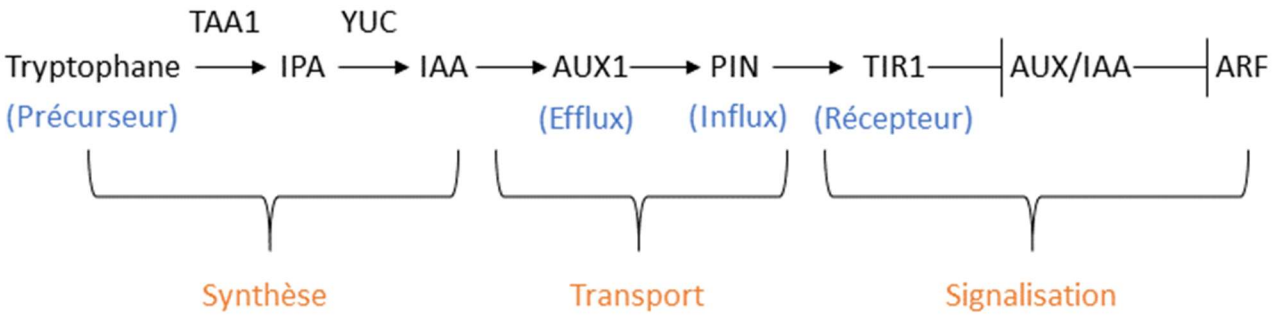

Figure 7 **: Synthèse et signalisation de l'auxine.** Les flèches représentent une induction, les barres représentent une répression (Selon Yang et al., 2019).

L'élongation cellulaire nécessite une augmentation de l'extensibilité de la paroi pectocellulosique, rendue possible notamment par son relâchement (Cosgrove, 2005). Ce relâchement contrôlé résulte de l'action de plusieurs protéines dont notamment d'expansines. Chez le bourgeon de rosier, l'induction des gènes *RhEXPA1, 2 et 3* codant pour des expansines prend place dans le bourgeon axillaire, à peine quelques heures après la décapitation sous le contrôle des cytokinines (Roman et al., 2016 ; Roman et al., 2017). Les cytokinines (CK) sont des hormones promotrices du débourrement, leur rôle dans ce processus sera détaillé ci-après.

3. Le débourrement résulte de l'intégration des effets de nombreux facteurs

La capacité à débourrer d'un bourgeon dépend de facteurs endogènes (fond génétique, hormones, nutriments, espèces réactives de l'oxygène (ROS), Girault et al., 2010 ; Mason et al., 2014 ; Barbier et al., 2015 ; Li-Marchetti et al., 2015 ; Porcher et al., 2021)) mais également de facteurs externes. Parmi ces facteurs externes, la disponibilité en eau et en nutriments (Demotes-Mainard et al., 2013), la température (Djennane et al., 2014) ainsi que la lumière (Djennane et al., 2014 ; Roman et al., 2016 ; Porcher et al., 2021) sont des déterminants majeurs. La réponse aux facteurs abiotiques est en effet critique pour la plante qui doit adapter son développement en fonction de la disponibilité des ressources, des saisons, des stress environnementaux et des compétitions avec d'autres plantes.

3.1. Implication de facteurs endogènes

3.1.1. Implication des hormones : L'auxine (IAA)

L'auxine, ou indole-3-acide acétique (IAA) est principalement synthétisée à partir d'un acide aminé, le tryptophane, qui est un précurseur des acides aminés aromatiques. Le tryptophane est ensuite converti en IPA (indole-3-pyruvate) grâce aux enzymes de la famille des Tryptophane Aminotransferase comme TAA1 (TRYPTOPHANE AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1), TAR1 et TAR2 (TRYPTOPHANE AMINOTRANSFERASE RELATED). L'IPA est ensuite converti en IAA par des enzymes appartenant à la famille YUCCA (YUC) (Figure 7).

La signalisation auxinique passe par l'ubiquitination et la dégradation des protéines AUX/IAA afin de lever leur effet inhibiteur sur les facteurs de transcription AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF ; Guilfoyle et Hagen, 2007). En présence d'auxine, l'interaction entre les AUX/IAA et le complexe SCF est favorisée et entraîne la dégradation des protéines AUX/IAA par le protéasome (Liu et al., 2007 ; Vernoux et al., 2010).

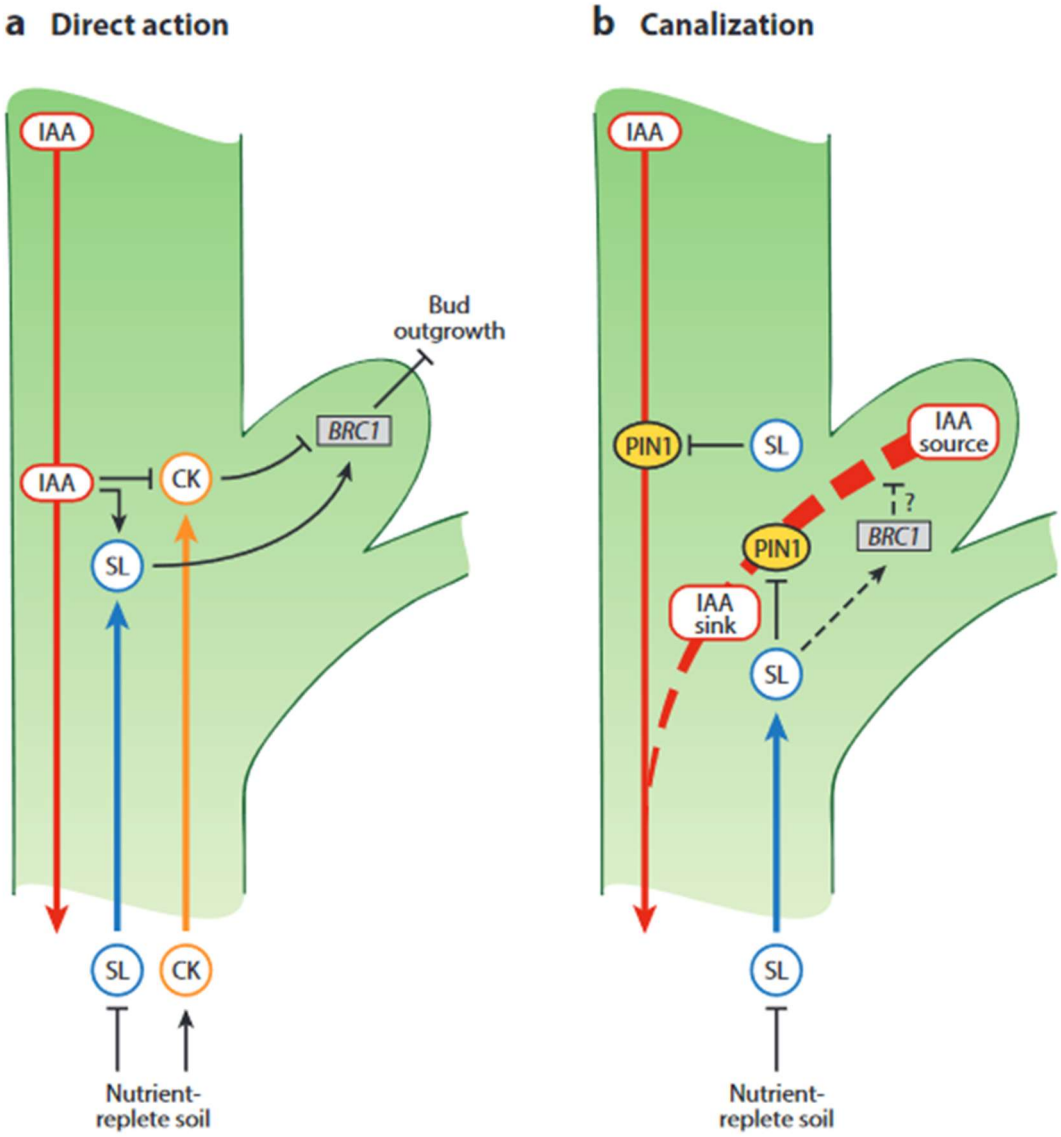

Figure 8 : **Modèles d'action de l'auxine sur le débourrement**. A) Modèle basé sur les seconds messagers. B) Modèle basé sur la canalisation de l'auxine. Selon Waters et al., 2017

Les ARFs se fixent sur des éléments *cis* répondants à l'auxine *AuxRE* (AUXINE RESPONSE ELEMENT) de promoteurs de certains gènes entrainant ainsi la répression ou l'induction du gène ciblé (Chapman et Estelle, 2009).

L'auxine est la première hormone identifiée dans le processus de la dominance apicale (Thimann et Skoog, 1933). L'auxine est produite par l'apex et circule par un flux polarisé basipète engendrant ainsi l'inhibition du débourrement des bourgeons situés plus bas le long de l'axe. Cependant, comme l'auxine est incapable de rentrer dans le bourgeon axillaire (Prasad et al., 1993), deux modèles ont été proposés pour expliquer l'action répressive de l'auxine provenant de la partie apicale sur le débourrement.

Selon le modèle du second messager (Figure 8A), l'auxine inhiberait le débourrement des bourgeons axillaires de manière indirecte par la répression de la synthèse de cytokinines (CK) et l'induction de la synthèse et de la signalisation des strigolactones (SL). Ces deux hormones circulent de manière acropète et sont capables d'entrer dans le bourgeon (Beveridge et al., 2000). CK et SL agissent directement au sein du bourgeon et de manière opposée (Brewer et al., 2009 ; Ferguson et Beveridge, 2009) : les CK promeut et les SL répriment le débourrement. L'équilibre de leurs effets opposés détermine le devenir du bourgeon (dormance ou débourrement). Le métabolisme des CK et des SL sera décrit par la suite.

Un second modèle a été proposé, basé sur l'hypothèse de la canalisation de l'auxine : un bourgeon axillaire doit être capable d'exporter son auxine vers la tige afin de pouvoir débourrer (Bennett et al., 2006 ; Prusinkiewicz et al., 2009). En agissant sur les protéines du transporteur d'efflux d'auxine PIN (PIN-FORMED), le flux basipète d'auxine produit par le méristème apical dans la tige empêcherait l'établissement du transport polarisé d'auxine PAT (Polar Auxin Transport, Sachs, 1975) entre le bourgeon axillaire et l'entre-nœud de la tige (Figure 8B). De plus, ce flux basipète d'auxine dans la tige inhiberait la synthèse de cytokinines et induirait la synthèse de strigolactones. De cette manière, ce flux empêcherait l'établissement du PAT entre le bourgeon axillaire et la tige. Or ce PAT est essentiel pour la formation de primordia foliaires et la vascularisation des bourgeons en cours de débourrement.

3.1.2. Les cytokinines (CK)

Le rôle des CK comme hormones stimulatrices du débourrement a été démontré en 1958 par l'application exogène de CK (Wickson et Thimann, 1958). Chez plusieurs espèces, l'apport d'analogues de CK (BAP, autrement appelé kinétine, benzyl adénine ou 6-benzylaminopurine) sur les bourgeons, même en présence d'auxine, permet le débourrement des bourgeons (Sachs et Thimann, 1964 ; Chatfield et al., 2000 ; Dun et al., 2012).

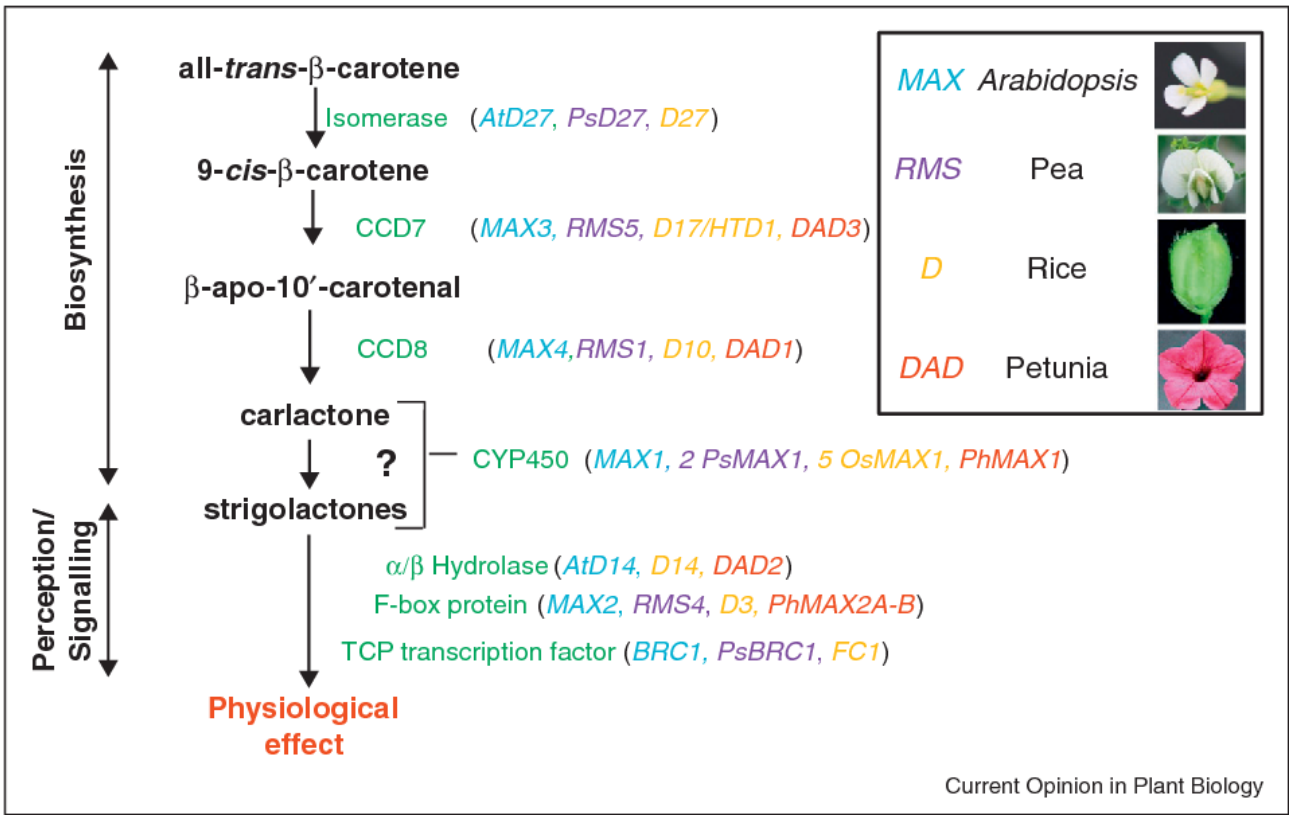

Figure 9 : **Principaux acteurs de la voie de synthèse et de signalisation des strigolactones.** D'après de Saint-Germain et al., 2013.

Ces études ont démontré que les CK contrecarraient l'action inhibitrice de l'auxine et ont mis ainsi en évidence l'action antagoniste de ces deux hormones. En effet, l'auxine inhibe également la synthèse des CK (Tanaka et al., 2006). Quand la dominance apicale est levée, la teneur en CK augmente dans la tige et dans le bourgeon, ce qui permet d'induire le débourrement (Leduc et al., 2014).

Cette augmentation de CK due à l'arrêt du flux basipète d'auxine (levé par la décapitation par exemple) est dû à une induction de la synthèse et du transport des CK. Cela a été démontré par l'étude de l'expression des gènes *IPT* (*ISOPENTENYL TRANSFERASE*) qui sont induits dès 3 heures après décapitation chez plusieurs espèces comme le pois, le riz ou le rosier (Tanaka et al. 2006 ; Xu et al., 2015 ; Roman et al., 2016). De même, l'application exogène de cytokinines sur des bourgeons axillaires stimule l'expression des gènes liés à l'export d'auxine : *PIN* et *AUX* chez le pois (Kalousek et al., 2010). Les CK sont également capables de réprimer des inhibiteurs du débourrement. En effet, les CK permettent de diminuer l'expression de *BRANCHED 1* (*BRC1*) et leur action est antagoniste à celle de l'auxine et des strigolactones dans la dominance apicale. Le rôle de BRC1 dans le contrôle du débourrement sera détaillé par la suite.

Dans le bourgeon, les CK contrôlent l'activité organogénétique du méristème apical caulinaire et l'élongation des organes préformés (Kurakawa et al., 2007). Elles sont notamment capables de stimuler la division et l'élongation cellulaire par la régulation des cyclines D (*CYCD* ; Roman et al., 2016).

3.1.3. Les strigolactones (SL)

Les strigolactones (SL) sont une classe d'hormones, d'abord identifiées comme déclencheurs de la germination de plantes parasites comme l'Orobanche. Elles sont synthétisées à partir de caroténoïdes dans les racines et les tiges puis transportées de façon acropète dans le xylème afin d'inhiber l'activité des bourgeons (Domagalska et Leyser, 2011). La synthèse ou la signalisation des SL fait intervenir chez *Arabidopsis* un groupe de gènes appelés *MAX* (Figure 9). Les mutants *max* (more axillary growth) d'*Arabidopsis*, ou les mutants *rms* (ramosus) et *dad* (decrease apical dominance) affectés dans la même voie chez le pois ou le pétunia respectivement, sont caractérisés par un phénotype hyper-ramifié, ce qui indique que les SL sont importantes dans la répression du débourrement (Arite et al., 2007 ; Saint-Germain et al., 2013). Les gènes *MAX 1, 3* et *4* permettent la synthèse de SL, qui vont être ensuite perçue par la protéine MAX2 impliquée dans la signalisation des SL.

Comme le montre le phénotype hyper-ramifié des mutants *max*, les SL sont des hormones inhibitrices du débourrement. L'application de l'analogue de SL GR24 inhibe le débourrement chez plusieurs espèces comme le pois ou le rosier (Dun et al., 2012 ; Bertheloot et al., 2020).

MAX2, protéine actrice de la signalisation des SL, augmente l'expression de *BRANCHED 1* (*BRC1*), un inhibiteur du débourrement (Leduc et al., 2014). Enfin, les SL agiraient aussi en empêchant l'exportation de l'auxine du bourgeon axillaire vers la tige en réprimant l'action des PIN (Brewer et al., 2009). L'auxine induit, elle, la synthèse des SL, suggérant une interaction positive entre l'auxine et les SL dans la répression du débourrement.

3.1.4. L'acide abscissique (ABA)

L'ABA est un dérivé terpénoïde qui intervient dans le processus d'endodormance (Ophir et al., 2009 ; Leida et al., 2010). Une augmentation de la teneur en ABA dans les bourgeons en réponse aux températures froides est en effet associée à l'endodormance (Noriega et Pérez, 2017 ; Beauvieux et al., 2018). Chez le rosier, une synthèse *de novo* et continue d'ABA contribue au maintien de l'endodormance du bourgeon par le contrôle de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 (Le Bris et al., 1999)

Le rôle répresseur de l'ABA sur le débourrement a été démontré chez différentes espèces comme la tomate, le pois, *Arabidopsis*, et le rosier (Tucker, 1976 ; Knox et Wareing, 1984 ; Gocal et al., 1991 ; Le Bris et al., 1999 ; Chatfield et al., 2000 ; Corot et al., 2017). L'application d'ABA sur la tige de rosier et chez d'autres espèces inhibe le débourrement de bourgeons paradormants situés à proximité (Chatfield et al., 2000 ; Cline et Oh, 2006 ; Corot et al., 2017) alors que la décapitation de l'axe primaire entraîne une diminution de la quantité d'ABA dans les bourgeons axillaires accompagnant leur débourrement (Knox et Wareing, 1984 ; Gocal et al., 1991, Leduc et al., 2014).

3.1.5. Les gibbérellines (GA)

Les GA sont des hormones qui induisent la différenciation des cellules du méristème chez les primordia de feuilles. Elles stimulent aussi l'élongation cellulaire au sein des phytomères et ainsi l'élongation des entre-nœuds, deux processus qui prennent place pendant le débourrement (Koornneef et Van der Veen, 1980 ; Dodsworth, 2009). Néanmoins, l'effet des GA sur le débourrement varie selon les espèces. Les GA ont un rôle inhibiteur du débourrement chez le riz et *Arabidopsis* (Silverstone et al., 1997, Lo et al., 2008 ; Ito et al., 2018). Au contraire, les GA promeuvent le débourrement chez le rosier ou *Jatropha curcas* (Choubane et al., 2012 ; Ni et al., 2017). En particulier, chez le rosier, la synthèse des GA sous le contrôle de *RoGA20-oxidase* (*RoGA20ox*) et de *RoGA3ox*, et la réduction du catabolisme GA à travers l'inhibition de *RoGA2ox* contribuent au débourrement des bourgeons (Choubane et al., 2012).

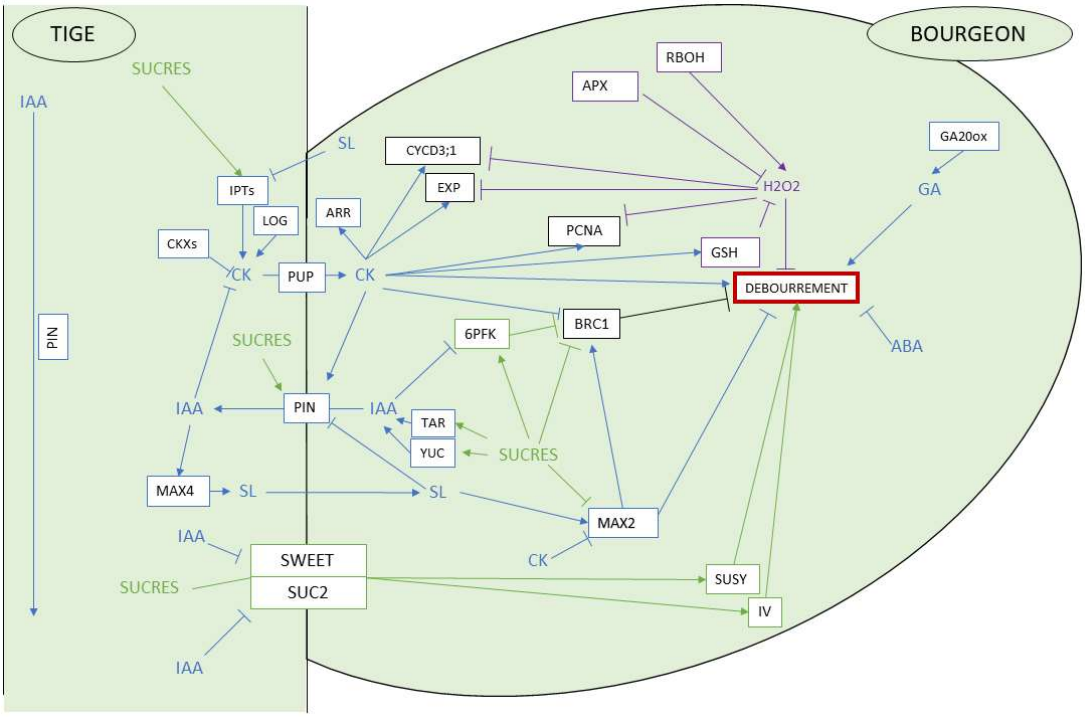

Figure 10 : ***Réseau de régulation des principaux acteurs du contrôle du débourrement chez le rosier Rosa 'Radrazz'****. Les flèches représentent une induction, les lignes droites représentent une répression. La couleur bleue représente la voie hormonale, en vert la voie des sucres, en violet la voie des ROS. * Girault et al., 2008 ; Girault et al., 2010 ; Henry et al., 2011 ; Choubane et al., 2012 ; Rabot et al., 2012 ; Rabot et al., 2014 ; Djennane et al., 2014 ; Barbier et al., 2015 ; Roman et al., 2016 ; Roman et al., 2017 ; Porcher et al., 2020 ; Porcher et al., 2021 ; Wang et al., 2021.

3.1.6. Les brassinostéroïdes (BR)

Les brassinostéroïdes (BR) sont des phytohormones stéroïdes qui influencent l'expansion cellulaire et la division cellulaire. Il existe peu d'informations sur le rôle des BR dans le contrôle du débourrement. Elles ont été notamment étudiées dans l'élongation des entre-nœuds (Wang et Li, 2006). Ces hormones pourraient également interagir avec les SL (Wang et al., 2013).

3.1.7. L'éthylène

L'éthylène est connu pour son implication dans la réponse aux blessures chez les plantes (voir pour revue Abeles 1973 ; Yang et Pratt, 1978). L'implication de l'éthylène dans le contrôle du débourrement est encore assez peu connue. Cette hormone est considérée comme inhibitrice du débourrement car elle favorise la dominance apicale chez le pois. Également, la suppression de l'éthylène chez le pétunia permet le débourrement (Yeang et Hillman, 1984). Cependant, elle a été inversement associée à l'induction du débourrement chez *Aechmea victoriana*, une broméliacée (Van Dijck et al., 1988), ce qui ne va pas dans le même sens de ce qui a été montré chez le pois et le pétunia.

3.1.8. Rôle intégrateur de BRC1

L'ensemble du réseau de régulation hormonale semble converger vers un facteur de transcription de type TCP pour TEOSINTE CYCLOIDEA PROLIFERATING CELL FACTORS appelé BRC1. Le gène *BRC1* est fortement exprimé dans les bourgeons dormants de plusieurs espèces comme le riz (*TB1*, Takeda et al., 2003), le rosier (Rh*BRC1*, Barbier et al., 2015) ou *Arabidopsis* (*BRC1*, Aguilar-Martinez et al., 2007). Il contribue à l'inhibition du débourrement des bourgeons. Chez le pois, son expression est stimulée par les SL et inhibée par les CK et le saccharose (Braun et al., 2011 ; Mason et al., 2014 ; Rameau et al., 2015). Une analyse transcriptomique d'un mutant *brc1* a révélé plusieurs groupes de gènes régulés par *BRC1*, en particulier des gènes liés à l'acide abscissique (ABA). BRC1 augmente la transcription de régulateur de l'ABA comme *ABF3* et *ABI5* (Rameau et al., 2015). De plus, Gonzalez-Grandio et al., (2017) ont montré que BRC1 permet une accumulation d'ABA dans le bourgeon et donc une répression du débourrement.

En conclusion, le débourrement est contrôlé par une interaction complexe de plusieurs hormones. En particulier, il existe une forte interaction entre l'auxine (IAA), les cytokinines (CK) et les strigolactones (SL) qui forment un réseau de régulation déterminant de la dominance apicale (Domagalska et Leyser, 2011 ; Barbier et al., 2019b) (Figure 10, lignes bleues).

3.2. Implication du métabolisme primaire

Les sucres sont également des acteurs majeurs en termes trophiques et en termes de signaux du contrôle du débourrement (Figure 10, lignes vertes). En tant que fournisseurs d'énergie, d'osmolytes et de matériaux de parois cellulaires, ils promeuvent le débourrement et l'établissement de l'axe qui en découle (Bonicel et al., 1987 ; Marquat et al., 1999 ; Le Hir et al., 2006). Il a été démontré grâce à des expériences de défoliation, de décapitation et de culture *in vitro* de bourgeons, que le débourrement est dépendant de la disponibilité en sucres (Girault et al., 2010 ; Henry et al., 2011 ; Rabot et al., 2012 ; Kebrom et al., 2012 ; Mason et al., 2014). De plus, il a été montré que l'augmentation rapide des teneurs en sucres après la levée de la dormance est corrélée avec l'induction de la transcription du gène *SUC2* codant pour un transporteur de saccharose (Maurel et al., 2004 ; Le Hir et al., 2006 ; Henry et al., 2011).

Chez le rosier, les transporteurs de sucres *SUCROSE TRANSPORTER 2* (*RhSUC2*) et *RhSWEET10* contrôlent le transport de saccharose dans le bourgeon (Henry et al., 2011 ; Roman et al., 2016) tandis que *RhSUSY* (*SUCROSE SYNTHASE*) et l'invertase vacuolaire *VACUOLAR INVERTASE 1* (*RhVI1*) catabolisent le saccharose en fructose et glucose utiles à la croissance (Girault et al., 2010 ; Rabot et al., 2012).

Également, le saccharose interagit avec le contrôle hormonal du débourrement (Barbier et al., 2015). En utilisant des bourgeons de rosier cultivés *in vitro*, il a été montré que le saccharose induit les gènes de synthèse d'auxine (*TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE RELATED 1* (*RhTAR1*), YUCCA 1 (*RhYUC1*)) et les gènes d'efflux d'auxine (*RhPIN*, *SERINE/THREONINE PROTEIN PHOSPHATASE 2A* (*RhPP2A*), *PINOID* (*RhPID*)) dans le bourgeon et réprime la signalisation des SL (*MORE AXILLARY BRANCHES 2* (*RwMAX2*)). Les sucres et l'auxine produit par le bourgeon apical ont un rôle antagoniste dans le contrôle du débourrement des bourgeons axillaires. Ainsi, l'apport d'auxine sur des bourgeons de rosier cultivés *in vitro* inhibe leur débourrement alors que l'apport de sucre permet de lever cette inhibition (Barbier et al., 2015 ; Bertheloot et al., 2020). Ces résultats suggèrent que l'auxine produite par l'apex permet la mise en place de la dominance apicale à condition que le statut de la plante en sucres soit faible.

Le saccharose stimule également l'expression d'un gène de synthèse des CK (*IPT3*) et des GA (*Ga20ox* et *Ga3ox*) (Roman et al., 2016). L'effet promoteur du saccharose sur le débourrement s'appuie également sur la répression du répresseur majeur du débourrement *BRANCHED 1* (*BRC1*) (Aguilar-Martinez et al., 2007 ; Finlayson et al., 2010 ; Dun et al., 2012 ; Wang, et al., 2019) par le saccharose (Barbier et al., 2015 ; Wang et al., 2021a).

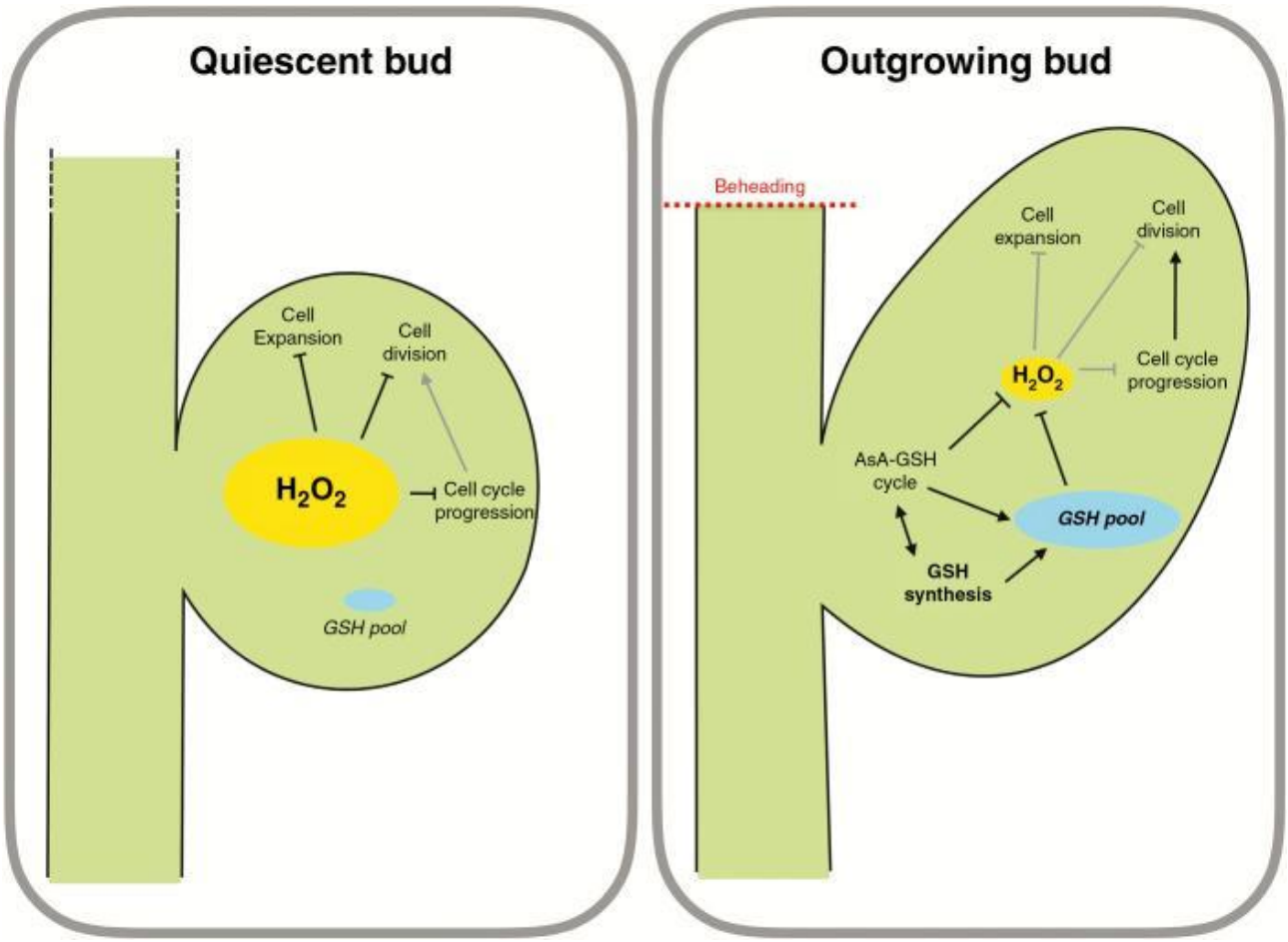

Figure 11 : **Représentation du rôle du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans le contrôle du débourrement**. Selon Porcher et al., 2020.

Le saccharose peut également jouer un rôle de signalisation pendant le débourrement comme cela a été montré par l'effet inducteur d'analogues de saccharose non-métabolisables sur le débourrement du rosier (Rabot et al., 2012 ; Barbier et al., 2015). Deux voies du métabolisme primaire du sucre : glycolyse/cycle de Krebs et voie oxydative de pentose phosphate (OPPP) ont été mises en évidence comme agissant en tant que voies de signalisation pour le sucre, en régulant de façon coopérative l'activité du gène *RhBRC1* (Wang et al., 2021a).

D'autres acteurs du métabolisme primaire sont importants dans le contrôle du débourrement. Ainsi, il a été montré que l'azote est nécessaire pour le débourrement des bourgeons chez le rosier. L'azote stimule le débourrement en augmentant la teneur en cytokinines chez le riz. Inversement, une déficience en azote stimule la synthèse de SL et inhibe le débourrement (Xu et al., 2015). Chez le rosier, la levée de la dominance apicale entraîne une augmentation de la teneur en acides aminés (en particulier en asparagine et glutamine) riches en azote, dans le bourgeon axillaire (Le Moigne et al., 2018).

Une déficience en phosphore réduit également le débourrement. En effet, une déficience en phosphore dans le sol augmente la production de SL dans les racines et leur transport dans la tige vers les bourgeons (Furet et al., 2014).

3.3. Métabolisme oxydatif et contrôle du débourrement

Plusieurs études montrent la contribution du métabolisme oxydatif au contrôle du débourrement (Figure 10, lignes violettes). Chez la vigne, l'application de sodium azide ou de cyanamide d'hydrogène ou encore un choc thermique sur des bourgeons endodormants réprime l'activité de la *CATALASE* (*CAT*) ce qui entraîne l'accumulation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et induit le débourrement (Or et al., 2002 ; Ophir et al., 2009 ; Pérez et al., 2009 ; Vergara et al., 2012 ; Sudawan et al., 2016 ; Meitha et al., 2018). Chez des bourgeons non-endodormants, H_2O_2 semblerait avoir un rôle opposé. En effet, le mutant *rboh* de tomate dont la capacité à produire de l'H_2O_2 apoplastique est altérée, possède un phénotype hyper-ramifié suggérant que l'H_2O_2 contribue à l'inhibition du débourrement (Sagi et al., 2004 ; Chen et al., 2016a).

Chez des bourgeons de rosier paradormants soumis à la dominance apicale, une forte quantité d'H_2O_2 est présente et contribue au maintien de la dormance du bourgeon. Après décapitation de la tige, la dégradation des ROS est activée ce qui entraîne une chute de la quantité d'H_2O_2 et le débourrement (Figure 11, Porcher et al., 2020). Dans le bourgeon de rosier, la dégradation des ROS est principalement due aux acteurs du cycle ascorbate-glutathion (AsA-GSH).

La transcription des gènes de synthèse du glutathion *RhGSH1* et *RhGSH2* ainsi que de l'ascorbate peroxydase *RhAPX1* et de la glutathion réductase *RhGR1* est en effet fortement stimulée dans le bourgeon après décapitation et pendant le débourrement tandis que la catalase *RhCAT* ne l'est pas. Ces surexpressions sont corrélées aux activités enzymatiques correspondantes (Porcher et al., 2020).

Au côté de ces régulations endogènes, des régulations exogènes dues facteurs de l'environnement s'exercent sur le débourrement.

3.4. La lumière : facteur environnemental majeur dans le contrôle du débourrement

Les bourgeons axillaires sont soumis à des régulations endogènes mais également à des régulations imposées par des facteurs de l'environnement. Par exemple, il est bien connu chez certains arbres qu'une longue période de froid est nécessaire pour lever l'endodormance et permettre le débourrement au printemps. De même, des températures élevées en serre accélèrent le débourrement chez le rosier (Djennane et al., 2014).

La disponibilité en eau est également un facteur important. En effet dans leur étude, Demotes-Mainard et al., en 2013 démontrent qu'une restriction temporaire en eau suivie par un retour à une situation de confort hydrique favorise le débourrement et le développement des axes chez le rosier. De même, il a été montré qu'une teneur en eau inférieure à 60% chez le frêne bloque la division cellulaire dans les bourgeons dormants (Cottignies et Ennane, 1988).

La lumière est un des facteurs les plus importants influençant le débourrement aussi bien par sa qualité spectrale que par son irradiance (Leduc et al., 2014 ; Demotes-Mainard et al., 2016 ; Huché-Thélier et al., 2016 ; Bertheloot et al., 2020). Chez le rosier, l'écodormance liée aux conditions de lumière est particulièrement forte.

3.4.1. Effet de la qualité de la lumière

Chez le rosier, les lumières rouge clair (R, autour de 660 nm) et bleue (B autour de 430 nm) induisent le débourrement alors que l'exposition à une lumière monochromatique rouge sombre (RS, autour de 730 nm) l'inhibe (Girault et al., 2008). Toutefois, lorsque le spectre de lumière blanche est enrichi en lumière RS, une augmentation de la ramification est observée chez le rosier (Crespel et al., 2020).

Chez le rosier, la lumière monochromatique B ou R est également capable de déclencher et de maintenir tous les processus impliqués dans le débourrement et le développement de l'axe qui en résulte, ce qui suggère une redondance au moins partielle des voies de transduction des lumières B et R (Abidi et al., 2013).

Le signal lumineux est perçu par les plantes via des photorécepteurs de plusieurs types. Parmi ceux-ci, les phytochromes (PHY) jouent un rôle particulièrement important et notamment le PHY B. Chez *Arabidopsis*, il existe 5 phytochromes (PHYA-E) (Sharrock et Quail, 1989). Les phytochromes perçoivent les lumières R et RS (Somers et al., 1991 ; Nagatani et al., 1993 ; Reed et al., 1994 ; Franklin et al., 2003) mais aussi B.

Le PHY B est impliqué dans le photo-contrôle du débourrement chez *Arabidopsis* et le sorgho. Une perte de fonction de ce phytochrome chez ces espèces entraîne une ramification réduite, suggérant son rôle promoteur du débourrement (Leduc et al., 2014). De plus, chez *Arabidopsis*, un traitement à la lumière rouge sombre cause la même réduction de ramification, suggérant que la perception de la lumière R par PHYB active ce photorécepteur et promeut le débourrement alors que la lumière RS inactive PHYB.

Une perte de fonction *phyb* entraîne une augmentation de la quantité d'ABA dans les feuilles d'*Arabidopsis* (Gonzalez-Grandio et al., 2013). Le gène inhibiteur du débourrement *BRC1* participe à la voie de signalisation de la lumière via *PHYB* agissant sur l'homéostasie de l'ABA. Lorsque de la lumière RS est ajoutée à la lumière blanche, l'expression de *BRC1* chez *Arabidopsis* est induite, celle de *BRC2* n'est pas affectée. Gonzalez-Grandio et al., (2017) ont montré que BRC1 induit l'expression de trois gènes *HB* (*HOMEOBOX PROTEIN*) qui stimulent l'expression du gène *NCED3* (*9-CIS-EPOXICAROTENOIDDIOXIGENASE 3*) de synthèse de l'ABA, entrainant une accumulation d'ABA dans le bourgeon et une suppression du débourrement.

Les cryptochromes CRY sont également des photorécepteurs importants dans le photo-contrôle du développement de la plante notamment en tant que régulateurs du cycle circadien (Lin et Todo, 2005) et réponse d'évitement de l'ombre (Shade Avoidance Syndrom ; Franklin, 2008). Ils perçoivent la lumière bleue. Une perte de fonction de ces cryptochromes n'entraîne pas d'effets sur le débourrement chez plusieurs espèces comme le pois, la tomate ou *Arabidopsis*, probablement du fait de la perception de la lumière bleue par d'autres photorécepteurs tels que les PHY.

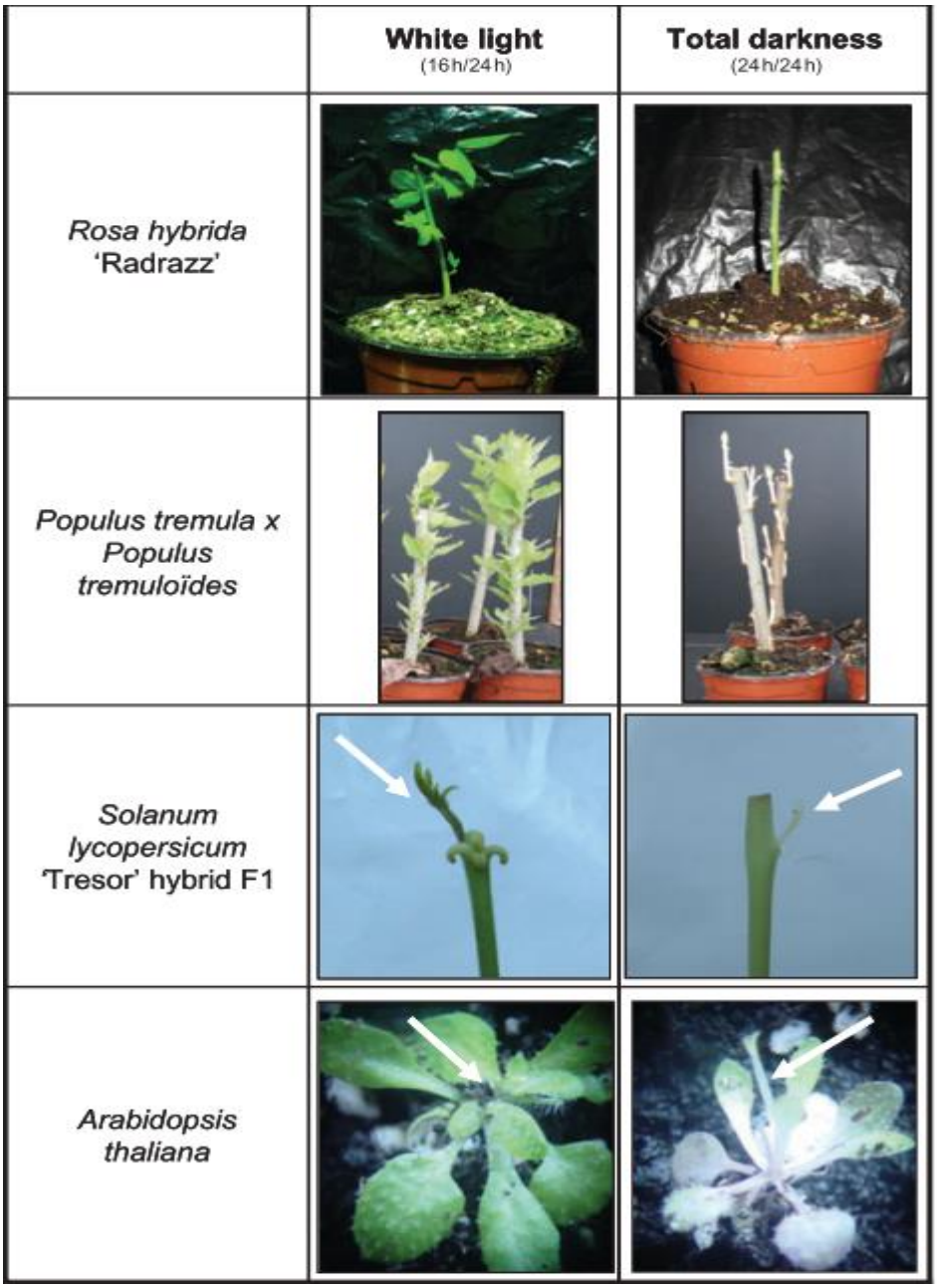

Figure 12 : **Débourrement des bourgeons axillaires de rosier (*Rosa hybrida*), peuplier (*Populus tremula x Populus tremuloïdes*), tomate (*Solanum lycopersicum*), et d'*Arabidopsis thaliana* après 12 jours de culture soit sous lumière blanche, soit à l'obscurité** (Selon Girault, 2008). Chez le rosier, le débourrement des bourgeons axillaires est totalement inhibé à l'obscurité, alors qu'il se produit chez les trois autres espèces. Ceci illustre le contrôle absolu par la lumière du débourrement chez le rosier.

3.4.2. Effet de la quantité de lumière

Chez certaines espèces d'angiospermes monocotylédones, comme le maïs, une faible intensité lumineuse diminue la ramification (le tallage) alors qu'une forte intensité lumineuse stimule le débourrement chez plusieurs espèces comme le pin, l'épicéa ou bien le rosier (Leduc et al., 2014).

Le rosier (*Rosa hybrida*) est une espèce particulièrement sensible à la lumière. Chez cette espèce, l'obscurité inhibe totalement le débourrement contrairement à ce qui est observé chez la tomate et le peuplier dont les bourgeons peuvent débourrer à l'obscurité. (Girault et al., 2008 ; Figure 12). De même, le gradient acrotone de ramification de la tige de rosier peut être fortement modifiée par l'application d'obscurcissement localisé le long de la tige de rosier (Djennane et al., 2014) ou bien par une exposition temporaire à une quantité faible de lumière suivie d'une exposition à une forte lumière (Demotes-Mainard et al., 2013). Ces observations indiquent qu'une régulation fine spatiale et temporelle du débourrement par la lumière s'exerce chez le rosier. Outre l'importance primordiale du rosier parmi les plantes ornementales, cette réponse en a également fait un excellent modèle pour explorer le photo-contrôle du débourrement des bourgeons axillaires chez les plantes (Leduc et al., 2014).

3.4.3. Régulation par la lumière des acteurs principaux du contrôle du débourrement

Par l'utilisation de conditions de lumière contrastées (notamment obscurité vs lumière blanche, monochromatique vs lumière blanche) chez le rosier, le photo-contrôle de nombreux gènes du débourrement impliqués dans les voies hormonales, des sucres, ROS, de la croissance et des division cellulaires a été démontré. Il a notamment été démontré que les CK sont les cibles initiales de la régulation du débourrement par la lumière (Roman et al., 2016). Plus précisément, l'exposition à la lumière des bourgeons déclenche une forte et rapide induction des gènes impliqués dans la synthèse des CK (*ISOPENTENYLTRANSFERASE* (*RhIPT3*, *RhIPT5*)), gènes d'activation des CK (*LONELY GUY 8* (*RhLOG8*)) et du transport (*PURINE PERMEASE 5* (*RhPUP5*)) et de la répression du catabolisme des CK *CYTOKININ OXIDASE/DEHYDROGENASE 1* (*RhCKX1*). Cela provoque une accumulation de CK dans les nœuds et les bourgeons ce qui entraîne une induction des gènes de synthèse et de transport d'auxine (*RhYUC1*, *RhPIN1*), des gènes de synthèse et de transport des sucres (*RhSUSY*, *RhVI*, *RhSUC2*, *RhSWEET10*), et la répression des gènes inhibiteurs du débourrement (*RhBRC1* et de la signalisation SL *RwMAX2*). Le photo-contrôle des CK stimule également en aval la voie AsA-GSH de dégradation des ROS ce qui réduit la quantité d'H_2O_2 dans le bourgeon et permet son débourrement (Porcher et al., 2021). Ces photo-régulations aboutissent à l'activation de gènes du cycle cellulaire comme *RhPCNA*, et de gènes d'expansion cellulaire comme *RhEXPA*, permettant la croissance des organes du bourgeon et la néo-organogenèse ce qui conduit au débourrement (Roman et al., 2016 ; Roman et al., 2017).

La régulation des GA par la lumière contribue également au photo-contrôle du débourrement chez le rosier au travers de l'induction des gènes de biosynthèse *RoGA20ox* et *RoGA3ox* et de la répression du gène catabolique *RoGA2ox* par la lumière (Choubane et al., 2012).

De manière logique, lorsque l'intensité lumineuse est faible, l'inhibition du débourrement chez le rosier est associée à des teneurs réduites de CK et à une augmentation des teneurs en ABA (Corot et al., 2017). Un apport exogène de CK et d'ABA sur la tige confirme leur action antagoniste dans le photo-contrôle du débourrement par l'intensité lumineuse (Corot et al., 2017). A l'obscurité, la répression du débourrement résulte de l'induction de gènes inhibiteurs comme *RhBRC1* et gène de la signalisation SL *RwMAX2* (Djennane et al., 2014 ; Roman et al., 2016) ainsi que la répression de la synthèse des CK et de l'augmentation de leurs catabolisme (Roman et al., 2016). La dégradation des ROS par la voie AsA-GSH est aussi réprimée par l'obscurité (Porcher et al., 2021). La répression du transport de saccharose et de son métabolisme à l'obscurité conduit à un basculement vers le métabolisme du sorbitol, similaire à un mécanisme de survie. Une forte induction de l'activité transcriptionnelle de la *NAD-DEPENDANT SORBITOL DEHYDROGENASE* (*RhNAD-SDH*) est observée chez des bourgeons exposés à l'obscurité (Girault et al., 2010, Roman et al., 2016).

La plupart des connaissances sur le débourrement et son photo-contrôle ont été acquises au niveau transcriptionnel (Girault et al., 2010 ; Djennane et al., 2014 ; Roman et al., 2016 ; Schneider et al., 2019 ; Porcher et al., 2020 ; Porcher et al., 2021). Pourtant, comme pour d'autres processus développementaux, les régulations post-transcriptionnelles sont probablement importantes et ont besoin d'être davantage explorées. Une étude récente chez le rosier a révélé des régulations post-transcriptionnelles du contrôle du débourrement. Elle concerne la régulation post-transcriptionnelle de BRC1 (*RhBRC1*) en particulier de sa région 3'UTR par la protéine PUMILIO RNA-BINDING PROTEIN FAMILY 4 (*RhPUF4*) en interaction avec les sucres (Wang et al., 2019).

4. Régulations post-transcriptionnelles dans le contrôle du débourrement

La régulation post-transcriptionnelle des gènes est un mécanisme permettant aux plantes de rapidement reprogrammer leur transcriptome en réponse à des facteurs endogènes ou environnementaux. La régulation post-transcriptionnelle implique une grande diversité de processus et d'acteurs comme des protéines pouvant se lier à l'ARN (RBP, RNA-binding proteins), l'épissage alternatif (Nilsen et Graveley, 2010 ; Kornblihtt et al., 2013) ou bien encore l'extinction de gènes (gene silencing) par des ARNs non-codants, les petits ARNs.

Les protéines RBPs sont principalement des protéines nucléaires et cytosoliques et régulent la maturation, la localisation cellulaire et la dégradation de l'ARNm. Elles possèdent des motifs de reconnaissance de l'ARN (RRM, RNA Recognition Motifs) ce qui leur permet de se lier à des séquences spécifiques du transcrit cible. L'étude de Wang et al., (2019) portant sur la régulation post-transcriptionnelle de *RhBRC1* par la protéine PUF4 est un exemple de régulation par les protéines RBPs et est une des seules études portant sur la régulation post-transcriptionnelle du débourrement.

L'épissage alternatif résulte de l'excision des introns de l'ARN pré-messager par le splicéosome (Floris et al., 2009). Il permet la production de plusieurs ARN messagers à partir d'un seul gène. L'épissage alternatif a été largement observé dans le cadre du cycle circadien. Il permet de répondre notamment aux changements de température et au rythme circadien (James et al., 2012 ; Perez-Santangelo et al., 2013).

L'extinction de gènes (gene silencing) est un mécanisme fréquent de régulation de gènes en réponse à des facteurs biotiques ou abiotiques (Kidner et Martienssen, 2005). Ce mécanisme, appelé également PTGS (Post Transcriptional Gene Silencing) est très répandu chez les plantes. Il est notamment utilisé comme mécanisme de défense contre les virus et les éléments transposables (Waterhouse et al. 2001). Ce mécanisme a été découvert suite à l'introduction d'un ARN double-brin chez *C. elegans*, ce qui induit une diminution de la traduction de protéines par clivage sur les ARNm associés (Fire et al., 1998). Cela a permis de mettre en évidence les petits ARNs, impliqués dans ce mécanisme.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à un type de petits ARN non-codants, les microARNs (miARNs). Nous allons détailler dans la suite de l'introduction le rôle des miARNs dans la régulation post-transcriptionnelle chez les plantes et leur potentiel rôle dans le contrôle du débourrement.

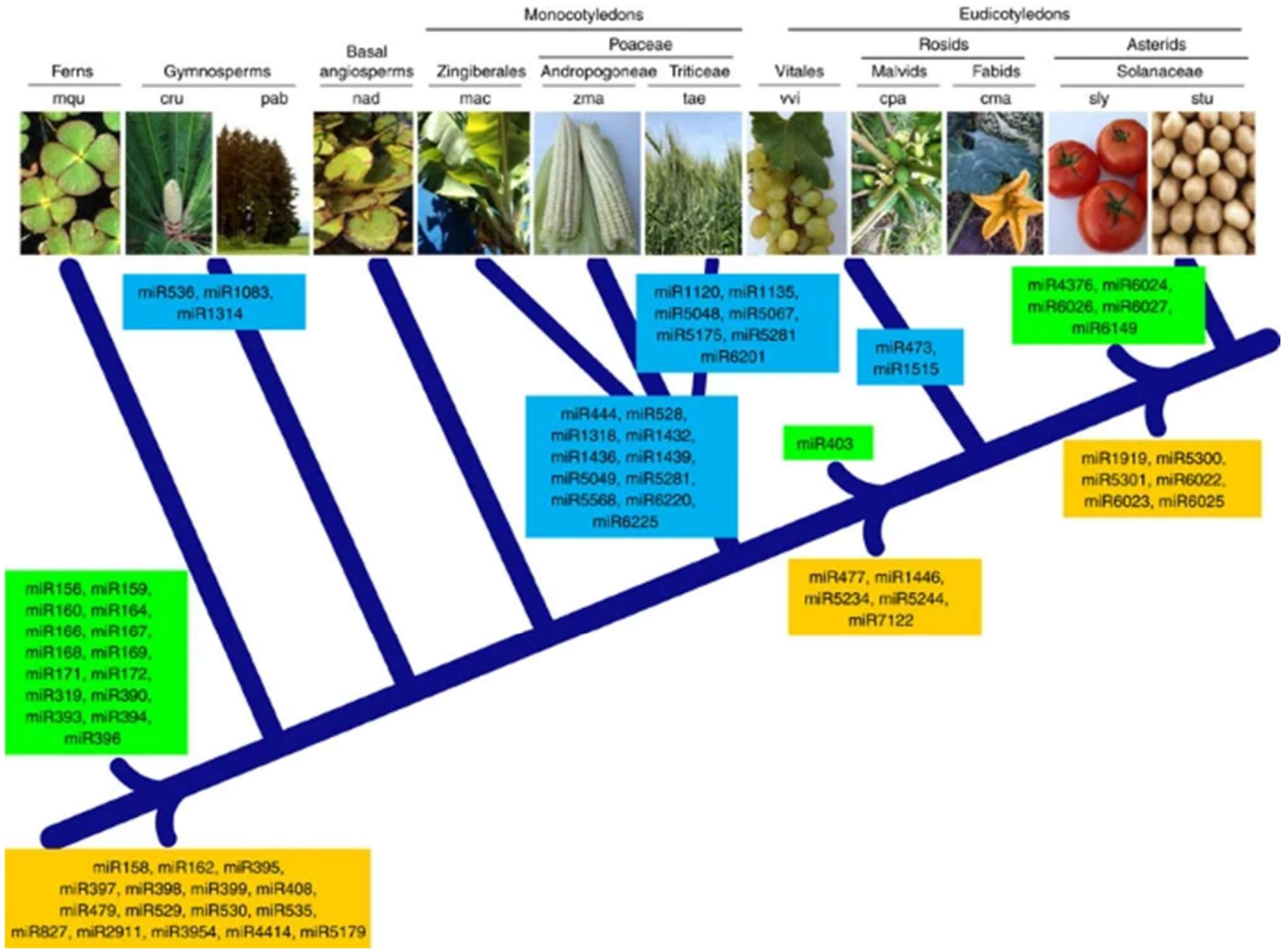

Figure 13 : **Distribution des familles de miARNs au travers de la phylogénie des plantes terrestres.** Les familles colorées en vert sont conservées dans pratiquement toutes les espèces correspondantes. Les familles colorées en orange sont conservées, mais manquantes chez quelques espèces correspondantes. Les familles colorées en bleu semblent être spécifiques à un groupe particulier d'espèces. Selon Chavez Montes et al., 2014.

4.1. Mécanisme général de l'action des petits ARNs

Il existe en particulier trois types majeurs de petits ARNs : les miARNs, les siARNs (small intefering RNA) et les piARNs (piwi-associated RNA, également appelé siARN associés à l'hétérochromatine soit hc-siARNs). Ces trois types se distinguent notamment par leur mode de biogenèse et la séquence de leurs précurseurs (Chen, 2009). Les miARNs et siARNs sont produits à partir d'un précurseur par les RNase III endonucléase et Dicer qui coupent le précurseur en duplex de petits ARNs avec 2-3 nucléotides libres à une extrémité. Ces duplex permettent de former les miARNs ou siARNs simples brins. Les piARNs dérivent probablement aussi d'un précurseur simple brin mais coupé par un autre Dicer que celui des miARNs. Tous ces petits ARNs peuvent se lier à des ARNs complémentaires de leurs séquences. Les miARNs et siARNs vont entraîner l'inhibition de la traduction d'ARNm cibles ou bien leur clivage (Chen, 2012) alors que les siARNs et piARNs peuvent entraîner une modification de la chromatine (Axtell 2013).

4.2. Les miARNs

La régulation par les miARNs est une composante majeure de la régulation post-transcriptionnelle de tous les processus biologiques chez les eucaryotes. D'abord découverts chez *C. elegans* (Wightman et al., 1993), les miARNs sont des molécules d'ARN simple brin non-codant qui ont une taille de 20-21 nucléotides. Chez *Arabidopsis*, 728 miARNs matures ont été identifiés (Kozomara et al., 2019). Tous les précurseurs de miARNs forment une structure tige-boucle qui possède une faible énergie, ce qui est une caractéristique unique et permet de les distinguer dans les analyses de prédiction (Zhang et al., 2006a). Les miARNs matures font partie de familles qui peuvent être conservées chez les plantes, c'est-à-dire qu'elles sont retrouvées chez plusieurs espèces (au moins 10 espèces, Zhang et al., 2005) avec un fort degré de similarité dans leurs séquences (Weber, 2004 ; Zhang et al., 2006a). Il a été dénombré 82 familles de miARNs conservées chez plusieurs plantes terrestres, allant des gymnospermes aux angiospermes (dicotylédones et monocotylédones, Chavez Montes et al., 2014). Ces familles ont été groupées selon leur distribution à travers les lignées et les espèces (Figure 13). D'autres miARNs sont dits non-conservés car ils ne sont retrouvés que chez certains groupes de plantes, une espèce ou sont parfois spécifiques à une variété locale (Rajagopalan et al., 2006 ; Fahlgren et al., 2007).

Les cibles des miARNs conservées sont fréquemment des gènes codant des facteurs de transcription qui ont un rôle important dans le contrôle développemental, alors que les gènes cibles non-conservés ont des fonctions plus diverses (Zhang et Zhang, 2012).

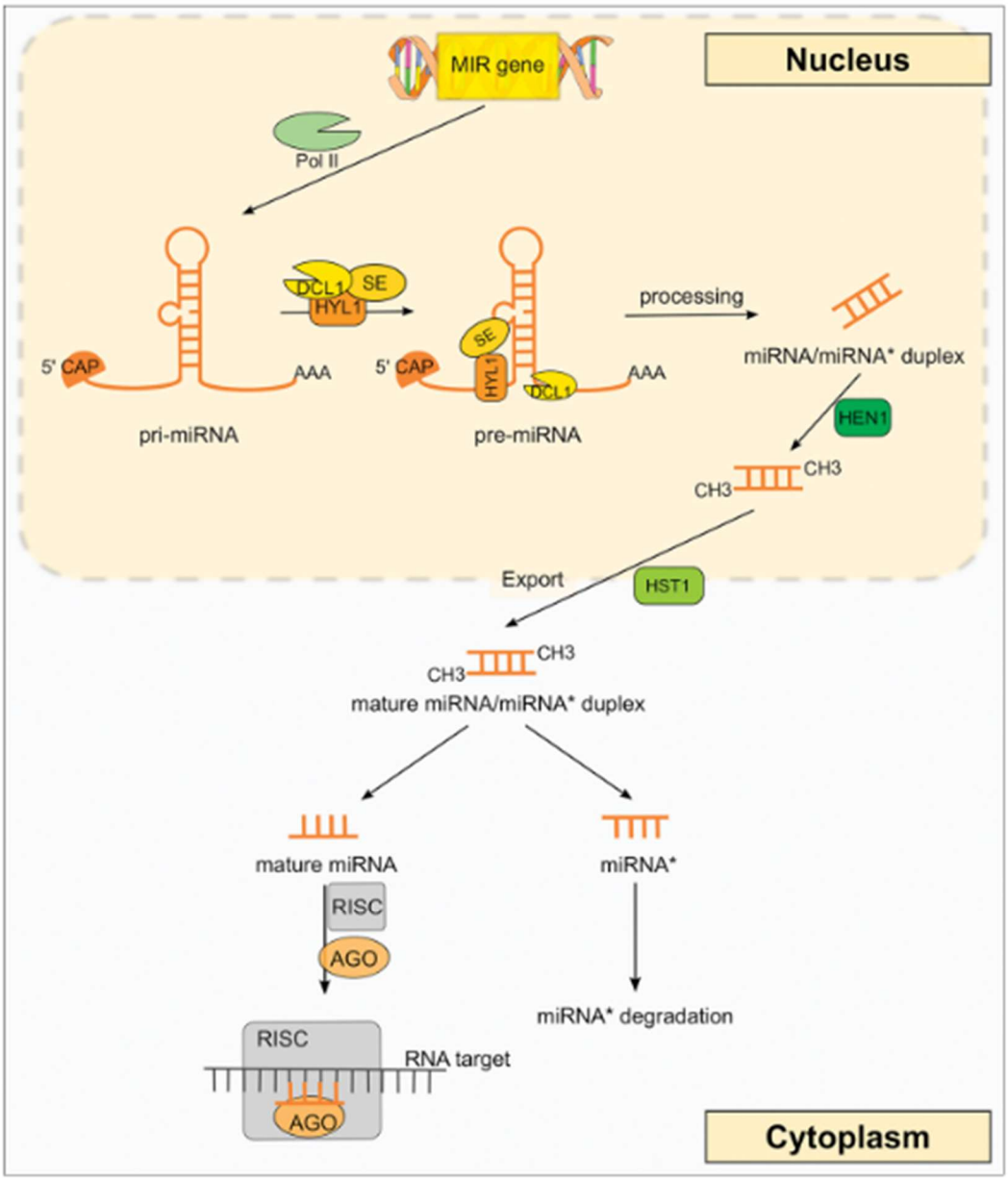

Figure 14 : **Biogenèse et modes d'action des miARNs chez les plantes.** Selon Pagano et al., 2021

4.2.1. Biogenèse des miARNs

Les gènes générant les miARNs sont transcrits par la RNA polymérase II en une première longue structure pliée, appelée miARN primaire (pri-miARN), ayant une taille de quelques centaines de nucléotides (Bartel, 2004 ; Zhu, 2008). Le miARN primaire est ensuite clivé par la protéine DICER-LIKE1 (DCL1), en interaction avec les protéines SERRATE (SE) et HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1) en une séquence précurseur avec une structure en épingle à cheveux (pre-miARN). Cette structure est ensuite transformée en un duplex miARN:miARN méthylé (Bartel, 2004 ; Budak et Akpinar, 2015) qui va se dissocier pour donner le miARN mature (Figure 14). Les extrémités 3' du duplex sont méthylées par la protéine HEN1 (HUA ENHANCER 1 ; Li et al., 2005) ce qui permet de les protéger de la dégradation.

De manière intéressante, il a été montré qu'une perte-de-fonction de HYL1, HEN1 ou DCL1 entraîne une hyper sensibilité à l'ABA (Lu et Fedoroff, 2000 ; Gim et al., 2014).

Enfin, une étude récente a démontré la présence de petits cadres de lecture ouverts dans la région 5' des pri-miARNs qui codent des petits peptides, appelés micro-peptides ou miPEPs. Ces miPEPs amplifient la transcription des pri-miARNs dont ils sont issus (Lauressergues et al., 2015).

4.2.2. Mécanisme d'action des miARNs et conséquences sur le développement des plantes

Une fois produit, un miARN s'associe avec le complexe "RNA-induced silencing complex" (RISC) et ce complexe va soit cliver l'ARN messager cible (processus prédominant chez les plantes), soit inhiber sa traduction par différents processus (Bartel, 2004 ; Voinnet, 2009 ; Navqi et al., 2012). Le complexe RISC est composé notamment d'une protéine argonaute (AGO1) actrice majeure du complexe (Lakhotia et al., 2014). Cette protéine est cruciale pour le développement des plantes. En effet, une perte de fonction du gène *ago1* chez *Arabidopsis* entraîne une augmentation de l'accumulation des ARNm ciblés par des miARNs (Vaucheret et al., 2004) ainsi que des effets pléiotropiques sur le développement des plantes (Bohmert et al., 1998).

Quelques connaissances ont été acquises sur le rôle de miARNs dans l'initiation des méristèmes (Zhang et al., 2006b ; Wang et al., 2011 ; Wu, 2013 ; Li et Zhang, 2016 ; Liu et al., 2018) et également sur la morphogenèse des feuilles (Pulido et Laufs, 2010 ; Maugarny-Calès et Laufs, 2018 ; Yang et al., 2018), deux processus qui contribuent à l'initiation des bourgeons (Sussex et Kirk, 2001).

Les miARNs conservés régulent des facteurs de transcription impliqués notamment dans les processus conduisant au débourrement d'un bourgeon : initiation de primordia foliaires par le méristème, morphogenèse foliaire, élongation des entre-nœuds. Par exemple, les miR165/166 régulent des gènes codants des facteurs de transcription impliqués dans la polarité des feuilles, les facteurs HOMEO DOMAIN LEUCINE ZIPPER -III (HD-ZIPIII). Les facteurs HD-ZIPIII contiennent 5 membres : REVOLUTA/INTERFASCICULAR FIBERLESS 1 (REV/IFL1), PHABULOSA (PHB), PHAVOLUTA (PHV), CORONA (CAN/AtHB15) et ATHB8 (Du & Wang, 2015). Trois de ces membres, PHB, PHV et REV sont impliqués dans la différenciation de la face adaxiale de la feuille. Ils sont exprimés dans la région centrale du méristème apical caulinaire (MAC) et le domaine abaxial de la feuille. Ils sont aussi impliqués dans la formation des méristèmes. Les miR165/166 sont parmi les miARNs les plus étudiés au vu de leurs rôles dans le développement des plantes.

De même, la production d'organes latéraux par les méristèmes est associée à la formation d'une frontière entre le primordium foliaire et le méristème sous le contrôle de gènes spécifiques. L'altération de l'expression de ces gènes peut entraîner un arrêt de la croissance et un développement anormal des feuilles, cotylédons et des fleurs (Berger et al., 2009; Hendelman et al., 2013). Parmi ces gènes de frontière, il existe chez *Arabidopsis thaliana,* un groupe de gènes, les gènes *CUC* (*CUP-SHAPED COTYLEDON*) codant des facteurs de transcription NAC (Berger et al., 2009). Les protéines NAC [NAM (NO APICAL MERISTEM), ATAF1 / 2 (Arabidopsis TRANSCRIPTION ACTIVATION Factor1/2) et CUC (CUP SHAPED COTYLEDON)] constituent une grande famille de facteurs de transcription spécifiques aux plantes et comptant plus de 100 membres chez *Arabidopsis*. Outre leur rôle dans le développement, les gènes *NAC* sont également impliqués dans les réponses aux stress biotiques et abiotiques. Un groupe de facteurs de transcription à domaine NAC, comprenant *CUC1*, *CUC2*, *NAC1*, *AT5G0780*, *AT5G61430* et *AT5G39610*, est régulé par le miR164 (Raman et al., 2008).

Chez *Arabidopsis*, la famille miR164 est composée de trois membres (miR164a, miR164b et miR164c) (Feng et al., 2014). Les plantes exprimant des versions de *CUC1* et *CUC2* résistantes au miR164 présentent une altération grave du développement embryonnaire, végétatif et floral, en raison de l'élargissement de différentes frontières (Raman et al., 2008).

Tableau I : **Principales familles de miARNs conservés et leur gènes cibles impliqués dans une modulation de la ramification.** MiR-SE : phénotype de surexpression du miARN. MiR-PF : phénotype de la perte de fonction ou de l'inactivation du miARN. GC-MR : phénotype du gène cible résistant ; GC-PF : phénotype de la perte de fonction ou de l'inactivation du gène cible ; GC-SE : phénotype de surexpression du gène cible.

Famille miARN	Gène cibles connus	Espèces	Phénotypes	Références
156	*SPL*	Riz, Lotus, Medicago, Soja, Arabidopsis Tomate Riz	MiR-SE : Augmentation de la ramification GC-PF : Augmentation de la ramification GC-MR : Réduction de la ramification	Wang et al., 2015a ; Wang et al., 2015b ; Aung et al., 2015 : Sun et al., 2019 ; Wei et al., 2012 Cui et al., 2020 Jiao et al., 2010; Miura et al., 2010
164	*NAC*	Arabidopsis, Coton	MiR-SE: Augmentation de la ramification TG-MR: Réduction de la ramification	Zhan et al., 2021
171	*GRAS/SCL /HAM*	Arabidopsis, Orge Tomate Arabidopsis Tomate Arabidopsis	MiR-SE : Réduction de la ramification MiR-PF : Augmentation de la ramification GC-PF : Réduction de la ramification GC-SE : Augmentation de la ramification GC-MR : Augmentation de la ramification	Wang et al., 2010; Curaba et al., 2013 Kravchik et al., 2019 Wang et al., 2010; Schulze et al., 2010 Huang et al., 2017 Wang et al., 2010
172	*AP2*	Arabidopsis	MiR-PF : Augmentation de la ramification	Lian et al., 2021
319	*TCP*	Agrostide Riz	MiR-SE : Réduction de la ramification MiR-PF : Augmentation de la ramification	Zhou et al., 2013 Wang et al., 2021b
393	*TIR1/AFB*	Riz	MiR-SE : Augmentation de la ramification	Xia et al., 2012
397	*LAC*	Riz	MiR-SE : Réduction de la ramification	Zhang et al 2013
444	*MADS*	Riz	MiR-SE : Réduction de la ramification GC-SE : Augmentation de la ramification GC-MR : Augmentation de la ramification	Guo et al., 2013
529	*SPL*	Riz	MiR-SE : Augmentation de la ramification MiR-PF : Réduction de la ramification	Yan et al., 2021b

4.3. MiARNs conservés et régulation du débourrement

Outre les voies de régulation décrites ci-dessus dans des mécanismes associés au débourrement, le rôle de miARNs conservés dans le contrôle de la ramification a été largement étudié chez quelques plantes modèles comme *Arabidopsis*, le maïs ou le riz, les deux derniers possédant un processus de ramification spécifique aux poacées, appelé tallage. Dans cette partie, nous fournissons un état des lieux des rôles des miARNs conservés dans la ramification. Les phénotypes de ramification des mutants miARNs et des gènes cibles résistants sont résumés dans le Tableau I.

L'étude du tallage chez le riz (*Oryza sativa*) a joué un rôle important dans la découverte du rôle des miARNs dans le contrôle du débourrement (Jiao et al., 2010 ; Miura et al., 2010 ; Yue et al., 2017).

A ce jour, le miR156 est une des familles de miARNs la mieux caractérisée. Le miR156 joue un rôle majeur dans la régulation de la ramification en ciblant un ensemble de gènes *SQUAMOSA PROTEIN-LIKE* (*SPLs*). Les facteurs de transcription SPLs sont retrouvés chez toutes les plantes et sont impliqués dans plusieurs processus de régulation du développement comme la transition de phase et la floraison, le contrôle plastochrone, le développement des feuilles, la sénescence du fruit et la réponse aux stress (Wang et Wang, 2015). Les gènes *SPLs* sont organisés en 9 classes, dont 6 sont régulées par le miR156 (Preston et Hileman, 2013). Chez le riz, une augmentation de l'expression de *OsSPL14* résulte d'une mutation dans son site de fixation du miR156 menant à une ramification réduite des bourgeons végétatifs (Jiao et al., 2010 ; Miura et al., 2010). De façon intéressante, cette mutation a un effet opposé sur la ramification pendant la phase reproductive, ce qui entraîne une augmentation de la ramification des inflorescences (panicule) et forme la base moléculaire d'un locus quantitatif connu sous le nom de *WEALTHY FARMER'S PANICLE* or *IDEAL PLANT ARCHITECTURE 1* (*IPA1*) qui améliore la productivité du riz.

Un niveau de miR156 élevé augmente le tallage chez le mutant dominant du maïs *Corngrass 1* (Chuck et al., 2007). Depuis ces premiers travaux, une augmentation de la ramification résultant de la surexpression du miR156 a été rapportée chez d'autres espèces comme *Arabidopsis* (Wei et al., 2012 ; Tian et al., 2014), la luzerne (Aung et al., 2015), le lotus (Wang et al., 2015b), le soja (Sun et al., 2019) et la tomate. Chez la tomate, l'augmentation de la ramification peut être réprimée par l'expression du gène *SPL13* résistant au miR156 (Cui et al., 2020).

La régulation de l'interaction miR156/SPL affecte la ramification au travers de l'initiation et du débourrement des bourgeons axillaires (Wang et al., 2015b). Au moins trois voies ont été associées avec cette augmentation de la ramification. Tout d'abord, *UNBRANCHED 3*, l'orthologue de *OsSPL14* chez le maïs, cible directement et réprime l'expression de gènes de synthèse et de signalisation des CK et induit l'expression des gènes de dégradation des CK, ce qui résulte en une diminution des niveaux de CK et de sa signalisation (Du et al., 2017). Deuxièmement, *OsSPL7*, une autre cible du miR156, réprime l'expression de *OsGH3.8* qui code une enzyme permettant l'association de l'auxine à l'aspartate (Dai et al., 2018). Donc, par son action post-transcriptionnelle sur les gènes *SPL*, le miR156 pourrait affecter la balance auxine/cytokinine qui est importante pour la formation et la croissance des méristèmes axillaires. Dernièrement, il a été observé que *OsSPL14* induisait directement l'expression de *OsTB1*, l'orthologue chez le riz du répresseur du débourrement *AtBRC1* (Lu et al., 2013). L'inhibition de *OsSPL14* par le miR156 réduirait l'effet inhibiteur de *OsTB1* sur le débourrement.

L'étude du tallage chez le riz a révélé d'autres miARNs qui contribuent à la régulation de la ramification chez cette espèce (Yue et al., 2017). MiR529 est très proche en termes de séquences avec le miR156 (entre 14 à 16 nt en commun) et cible également un ensemble de gènes *SPLs*. MiR529 est retrouvé chez les monocotylédones mais a été perdu chez certaines dicotylédones (Morea et al., 2016). Récemment, Yan et al., (2021) ont montré que la modulation de l'activité du miR529 augmente le tallage du riz d'une manière similaire au miR156.

Une augmentation du tallage a été également observé chez des lignées de riz surexprimant le miR393. Ce miARN cible des gènes codant des récepteurs d'auxine (*TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1* (*OsTIR1*) et *AUXIN SIGNALING F-BOX 2* (*OsAFB2*)). Par conséquent, les lignées de riz surexprimant le miR393 montrent une réponse à l'auxine réduite et une expression réduite du gène *OsTB1*, ce qui peut expliquer l'induction du débourrement (Li et al., 2016). Une signalisation modifiée de l'auxine a été également observée chez des lignées de riz surexprimant une version résistante au miR160 du gène *AUXIN RESPONSE FACTOR 18* (*OsARF18*) et présentant un tallage réduit (Huang et al., 2016).

Tandis qu'une surexpression des *miR156*, *miR529* ou *miR393* augmente le tallage du riz, la surexpression du miARN spécifique de monocotylédones, le *miR444* a un effet opposé (Guo et al., 2013). MiR444 cible *OsMADS57,* un gène exprimé dans les bourgeons en développement et qui réprime l'expression du gène *D14* codant un récepteur SL. La surexpression du *miR444* entraîne une augmentation de la réponse SL et donc l'inhibition du débourrement.

Enfin, une surexpression du *miR397* qui cible chez le riz les gènes *OsLAC*, des laccases polymérisant les monolignols en lignines (Zhao et al., 2013 ; Berthet et al., 2011), entraîne également une légère réduction du nombre de talles chez le riz (Zhang et al., 2013).

L'étude d'*Arabidopsis thaliana* a également révélé le rôle potentiel de trois miARNs dans le contrôle du débourrement. Par exemple, le miR171 cible des gènes codant les facteurs de transcription GRAS *SCARECROW-LIKE SCL6-II*, *SCL6-III* et *SCL6-IV* (également nommé *LOST MERISTEMS 1-3* (*LOM*) ou *HAIRY MERISTEM* (*HAM*)) (Schulze et al., 2010 ; Wang et al., 2010). Ces protéines sont nécessaires pour la formation de méristèmes axillaires, et spécifient l'identité de cellules souches aux cellules de la zone centrale du méristème (Zhou et al., 2018 ; Han et al., 2020). Les lignées d'*Arabidopsis* surexprimant le *miR171* montrent une forte réduction du nombre d'axes secondaires, phénotype qui est inversé par l'expression de la version résistante au miR171 de n'importe lequel des trois gènes *HAM* (Wang et al., 2010). Également chez la tomate, une activité réduite du miR171 ou la surexpression des gènes *HAM* limite la ramification (Huang et al., 2017 ; Kravchik et al., 2019). *SlGRAS24* module la signalisation auxinique et celle des GA, mais il n'a pas été démontré si cela affectait la formation des méristèmes axillaires ou le débourrement (Huang et al., 2017). La fonction du miR171 dans l'inhibition de la ramification semble être conservée chez les monocotylédones, car il a été montré qu'une surexpression de ce miARN chez l'orge réduit la ramification (Curaba et al., 2013).

Chez *Arabidopsis*, miR164 cible un ensemble de gènes NAC, notamment les gènes *CUP-SHAPED COTYLEDON* (*CUC*) qui sont importants pour un large éventail de processus de développement liés aux méristèmes. De récentes études réalisées sur le coton et dans le système hétérologue d'Arabidopsis suggèrent que la répression de *CUC2* par le miR164 est importante pour le débourrement (Zhan et al., 2021), plus précisément, via l'interaction de *CUC2* avec *BRC1* qui module les niveaux d'ABA au cours du débourrement.

Le rôle antagoniste des miR172 et miR156 dans la régulation de la ramification chez *Arabidopsis* a été également démontré (Wang et al., 2009). Le mutant quintuple des 5 gènes *MiR172* montre en effet une augmentation de la ramification tout comme une lignée surexprimant *MIR156b* (Wei et al., 2012 ; Lian et al., 2021). *MIR172a* et *d* sont ceux qui jouent un rôle majeur dans la répression de la ramification chez *Arabidopsis* (Lian et al., 2021).

Des recherches sur des plantes un peu moins étudiées ont également apporté des connaissances supplémentaires sur le rôle d'autres miARNs dans la ramification. Par exemple, chez l'agrostide (*Agrostis stolonifera*), la surexpression du miR319 entraîne une légère réduction du tallage (Zhou et al., 2013b). MiR319 cible un ensemble de facteurs de transcription *TEOSINTE BRANCHED1/CYCLOIDEA/PCF* (*TCP*) qui sont impliqués dans la transition prolifération cellulaire-différenciation cellulaire pendant le développement des plantes (Palatnik et al., 2003). En accord avec ces résultats, des travaux récents chez le riz montrent que l'inactivation du miR319 est corrélée avec l'augmentation de l'expression de *OsTCP21* et l'augmentation du nombre et de la longueur des bourgeons de talles (Wang et al., 2021b). Chez le thé *Camellia sinensis*, l'expression de *MIR319c* est significativement réduite pendant le débourrement alors que sa cible *TCP2* est significativement induite (Liu et al., 2019a).

Finalement, il semblerait qu'un certain nombre de miARNs conservés contribuent au contrôle de la ramification. Alors que dans certains cas, leur effet pourrait être attribué précisément à de l'initiation du méristème ou au débourrement (Wang et al., 2015b), ceci n'a pas été systématiquement analysé (Huang et al., 2017 ; Lian et al., 2021). De plus, comme certains couples miARNs/gène cible sont impliqués dans divers processus, l'effet sur la ramification pourrait parfois être indirect. Cela pourrait être le cas par exemple du miR156 qui affecte la durée de la phase végétative et donc le nombre de nœuds portant des méristèmes axillaires.

4.4. Interactions entre lumière et expression des gènes codant des miARNs

La lumière est un signal environnemental majeur qui contrôle le débourrement chez plusieurs espèces végétales. La régulation par la lumière du débourrement au niveau transcriptionnel a été très bien documentée (Girault et al., 2008 ; Rabot et al., 2014 ; Roman et al., 2016 ; Porcher et al., 2020). Cependant, il existe à ce jour peu de connaissances sur l'implication des miARNs dans les mécanismes de débourrement des bourgeons régulés par la lumière. Par conséquent, nous présentons ici quelques exemples d'effet spécifiques de la lumière sur quelques couples miARNs/gène cible.

En particulier, la lumière affecte l'expression de quelques gènes *MIARN* spécifiquement. La transduction des signaux des lumières Rouge (R) et Bleue (B) implique des photorécepteurs, dont les phytochromes (PHY) et les cryptochromes (CRY) et leurs effecteurs en aval comme *ELONGATED HYPOCOTYL 5* (*HY5*) et *PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS* (*PIF*).
PHYB joue un rôle important dans le photo-contrôle du débourrement (Kebrom et Mullet, 2016).

Récemment, Holalu et al., (2020) ont rapporté que PIF4 et PIF5 contribuent à la suppression de la ramification, résultant de la perte de fonction *phyb* et d'un ratio faible R:RS (Rouge clair : Rouge Sombre). Ce phénotype est corrélé à l'induction de l'expression de *BRC1* par PIF4/PIF5 et à l'accumulation d'ABA dans les bourgeons. De façon intéressante, plusieurs études indiquent que la modulation de l'expression de miARN contribue à la réponse à la lumière médiée par PHY, soulevant l'hypothèse que ceci pourrait contribuer à la modulation de la ramification. Par exemple, l'analyse de miARNs et de leur gènes cibles régulés par PHYB chez les feuilles de riz a permis d'identifier 135 miARNs différentiellement exprimés entre le sauvage et un mutant *phyB* (Sun et al., 2015). Ces résultats suggèrent que ces miARNs sont directement ou indirectement contrôlés par PHYB et participent à la réponse à la lumière médiée par PHYB. De la même manière, HY5 et les facteurs de transcription PIFs ont été rapportés comme contrôlant directement l'expression de plusieurs gènes *MIARN* (Zhang et al., 2011 ; Xie et al., 2017). Plus récemment, chez *Arabidopsis*, PIF4 a été montré comme induisant l'expression des gènes codant les miR156/157, miR160, miR165/166, miR167, miR170/171 et le miR394 et réprimant l'expression des gènes codant les miR172 et miR319, en se fixant sur les promoteurs de ces gènes *MiARNs* (Sun et al., 2018). Comparé au type sauvage, les mutants miARNs correspondant ont un phénotype d'hypocotyle altéré (hypocotyle plus court chez les mutants *miR319b* et *miR160b* placés sous lumière R), renforçant le rôle de miARNs spécifiques dans la photomorphogenèse (Sun et al., 2018). Chez la plante extremophile *Eutrema salsugineum*, sous l'action à long terme de la lumière R, Pashkovskiy et al., (2021) démontrent une augmentation de l'expression de *PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PIF4* et *PIF5*, et simultanément l'augmentation de l'expression des *MiR395*, *MiR408* et *MiR165*. De plus, il est également observé une diminution de l'expression de *HY5*, *MiR171*, *MiR157* et *MiR827*. Ces résultats suggèrent que la quantité de ces miARNs chez *E. salsugineum* est photo-régulée par PHY et PIF. Également, dans les feuilles de *Solanum tuberosum*, la lumière R peut induire l'expression des miR398, miR399, miR408, miR482, miR8036 et miR8049 (Qiao et al., 2017). Parmi les miARNs dont l'expression est photo-régulée, quelques-uns (*MiR156*, *MiR171*, *MiR172*, *MiR319*) sont impliqués dans le contrôle du débourrement (Partie 4.3.). Ces observations nous indiquent donc que la lumière via une voie dépendante de PHY pourrait contrôler le débourrement à travers la modification de l'expression de plusieurs miARNs.

Un événement majeur du débourrement est l'initiation et l'expansion des feuilles. Alors qu'aucune donnée expérimentale rapporte l'interaction directe entre la signalisation de la lumière et la biogenèse des miARNs dans le contrôle de l'organogénèse des feuilles pendant le débourrement, quelques travaux démontrent que la lumière régule l'expansion foliaire (Romanowski et al., 2021) et que cela se produit en partie par la régulation de miARNs (Pashkovskiy et al., 2016). Plus précisément, Pashkovskiy et al., (2016) rapportent que la lumière B entraîne une augmentation significative de l'expression du *MiR167* ce qui entraîne une diminution du niveau de transcrits d'*ARF6*.

Les facteurs de transcription ARF jouent un rôle important dans la transcription de la voie des gènes régulés par l'auxine en interagissant avec les protéines Aux/IAAs, voie importante dans le contrôle du débourrement (Vanneste et Friml, 2009 ; Dierck et al., 2016). De même, la lumière B réprime spécifiquement les *miR156* et *miR157* et induit leur gène cible *SPL9* et *SPL15* pendant le développement des plantules de *Brassica rapa* subsp. Rapa (Zhou et al., 2016). Ces résultats combinés à un phénotype d'augmentation de ramification causé par la surexpression du miR156 chez *Brassica napus* (Wei et al., 2010) supporte l'hypothèse d'un lien entre signalisation de la lumière et la régulation des miARNs et suggère un rôle du couple miR156/SPL comme un élément central du contrôle du débourrement en réponse à la lumière. Plus récemment, Dong et al., (2020) ont trouvé 20 miARNs différentiellement exprimés chez les feuilles de tomate traitées avec la lumière bleue. Parmi eux, l'expression de *sly-miR9472-3p* est induite par la lumière B et est négativement corrélé à l'expression de sa cible *IPT5*, un gène de synthèse des CK qui jouent un rôle crucial dans l'induction du débourrement des bourgeons axillaires (Barbier et al., 2015 ; Roman et al., 2016). Ces données suggèrent que les miARNs pourraient bel et bien être impliqués dans le photo-contrôle de l'expansion foliaire pendant le débourrement.

5. Problématique et objectifs de la thèse

La ramification est un élément déterminant pour l'élaboration de l'architecture des plantes. Son contrôle permet un meilleur rendement et une meilleure qualité visuelle des plantes, dans le but de satisfaire les attentes des consommateurs (Boumaza et al., 2009). L'architecture des plantes dépend notamment de la capacité des bourgeons axillaires à débourrer. Ce processus est fortement dépendant de facteurs environnementaux, notamment la lumière (Leduc et al., 2014). De nombreuses études ont porté sur la compréhension de ce mécanisme complexe qu'est le débourrement par l'identification de facteurs internes et de l'environnement le contrôlant. Un réseau de régulation transcriptionnel du photo-contrôle du débourrement a notamment été établi impliquant les hormones (SL, IAA, GA, CK, ABA), les nutriments (sucres, azote) ainsi que les espèces réactives à l'oxygène (ROS). Les travaux de notre équipe ont porté notamment sur le rosier buisson *Rosa* 'Radrazz' qui est une plante ayant une place importante dans l'horticulture ornementale et qui présente la particularité d'avoir un besoin absolu de lumière pour déclencher son débourrement. Ceci en fait un modèle végétal intéressant pour l'étude du photo-contrôle du débourrement (Girault et al., 2008). Cependant, il existe peu de connaissances sur les régulations post-transcriptionnelles du débourrement, en réponse à la lumière.

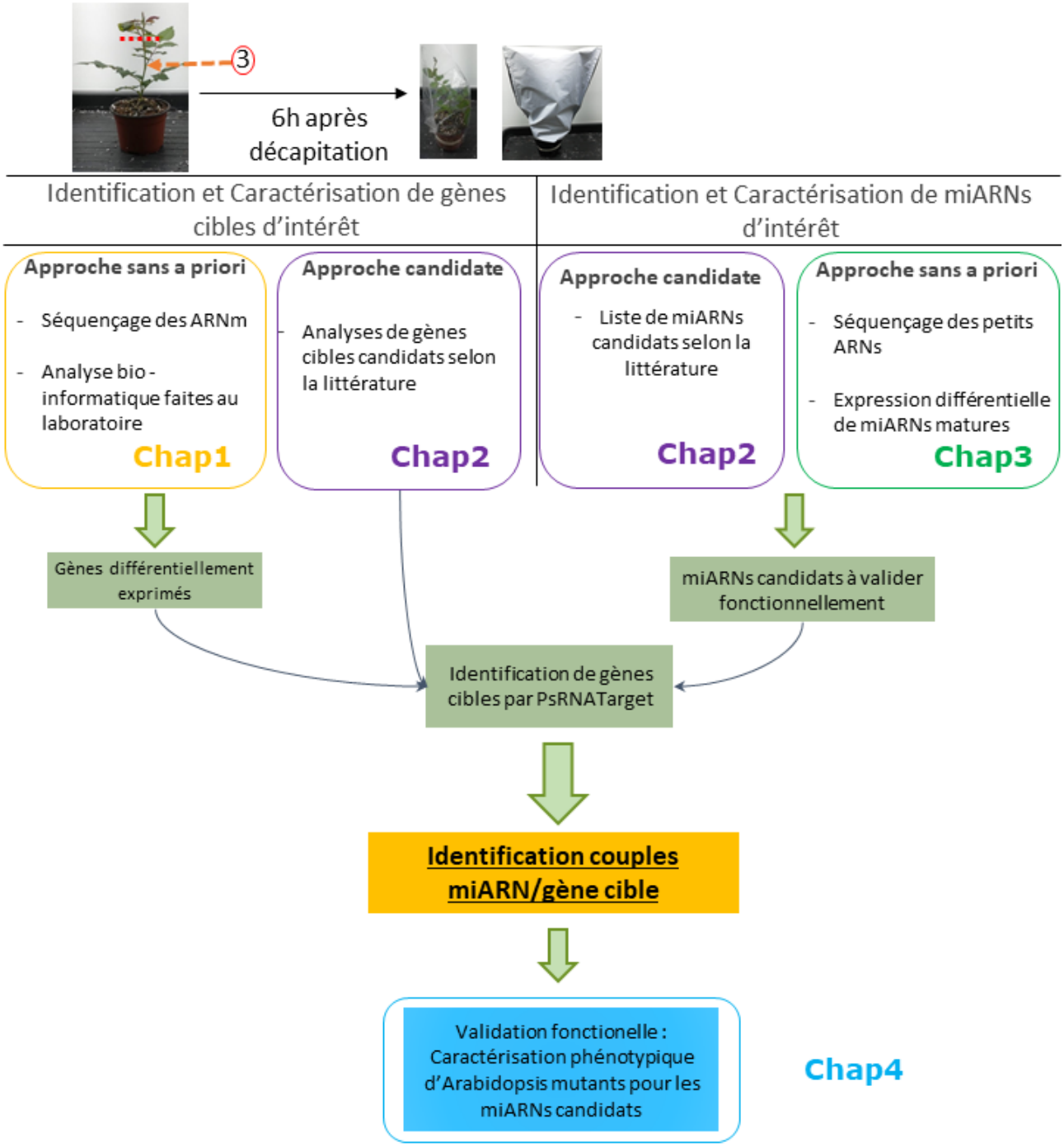

Figure 15 : **Représentation schématique de la démarche suivie pour répondre aux objectifs de thèse et des quatre chapitres de thèse.**

C'est pourquoi cette thèse a pour objectif d'apporter de nouvelles connaissances sur les mécanismes post-transcriptionnels impliqués dans le contrôle du débourrement (Figure 15). Elle se focalise en particulier sur le rôle des microARNs (miARNs) et vise à identifier chez le rosier des couples miARN/gène cible pouvant jouer un rôle important dans le débourrement et son photo-contrôle.

Dans ce but, nous avons mené une approche *a priori* basée sur les données de la littérature et une approche sans *a priori*. Nos travaux ont conduit à :

1) La réalisation et à l'analyse d'un séquençage des ARNm présents dans les bourgeons axillaires de rosiers placés à la lumière ou à l'obscurité et à un temps court après la levée de dominance apicale (6 heures après la décapitation de la tige) pour identifier les acteurs et mécanismes précoces du photo-contrôle du débourrement (Chapitre I).
2) La réalisation et l'analyse d'un séquençage de petits ARNs provenant de ces mêmes bourgeons axillaires. A partir de ce séquençage, nous avons mené deux approches pour identifier les miARNs présents dans les bourgeons et différentiellement accumulés au temps 6h entre les deux conditions de lumière :
    a) Une approche candidate après analyse de la littérature. Cette approche se base sur la recherche de miARNs déjà décrits dans la littérature pour leur rôle dans le contrôle du débourrement chez d'autres espèces et voir s'ils sont également exprimés dans le bourgeon de rosier (Chapitre II).
    b) Une approche sans *a priori* par l'analyse d'expression différentielle des miARNs matures selon la condition d'éclairement afin de recherche de nouveaux miARNs non encore décrits pour leurs rôles dans le débourrement et son photo-contrôle (Chapitre III).

Puis à partir de la liste des miARNs différentiellement exprimés que nous avons identifiés, et de leurs séquences nucléotidiques, une recherche *in silico* de séquences complémentaires sur de potentiels gènes cibles a été menée. Une analyse comparée des expressions des couples potentiels miARN/gènes cibles a été ensuite conduite pour identifier les couples qui présentent des corrélations négatives entre l'expression du miARN et le gène cible potentiel. Ces couples ont alors été considérés comme pouvant potentiellement jouer un rôle fonctionnel dans le débourrement du bourgeon.

3) La validation fonctionnelle de deux des couples sélectionnés a été entamée par l'étude de l'impact de la surexpression des miARNs dans un système hétérologue (*Arabidopsis*). Une analyse phénotypique des plantes transformées a été conduite (Chapitre IV).

Matériel et Méthodes





Figure 16 : **Parc des pieds mères de *Rosa* ‘Radrazz’** (gauche) **et Boutures de rosiers placées sous tunnel d’enracinement.** (droite) (Photos : Julie Mallet).

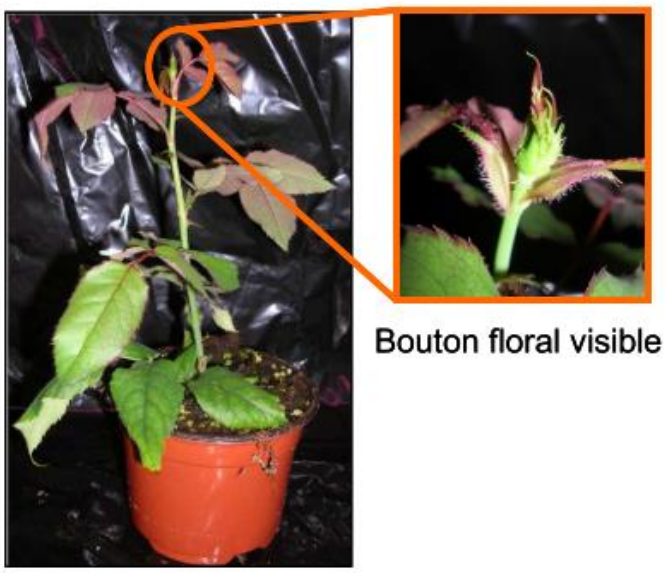

Figure 17 : **Plante de *Rosa* 'Radrazz' au stade bouton floral visible** (selon Girault, 2009).

1. Matériel végétal et culture des plantes

1.1. Multiplication végétative et culture en serre des rosiers

Des boutures “simple nœud” sont réalisées sur des pieds-mères de *Rosa* ‘Radrazz’ âgés de 3 ans maximum, sélectionnés depuis 2005, date à laquelle les recherches sur le débourrement des bourgeons et l'architecture du rosier buisson ont démarré dans l’équipe (Figure 16). Le rosier *Rosa* ‘Radrazz’ est un rosier triploïde remontant, connu pour être résistant aux maladies, comporte un axe primaire composé de 8 à 12 phytomères, se terminant par un bouton floral. Chaque phytomère possède un bourgeon situé à l’aisselle d’une feuille, elle-même composée de 3 à 7 folioles.

Le bouturage se réalise par multiplication végétative, permettant de réduire la variabilité inter-individus par le brassage génétique. Les boutures d’un nœud sont réalisées sur la partie médiane des axes portant une feuille possédant de 5 à 7 folioles et portant un bourgeon dormant puis sont plantées dans des mottes FERTISS (FERTIS, SAS, Boulogne Billancourt, France) et placées sous des tunnels "d'enracinement" à forte teneur d’humidité (80-90%) pendant 3 à 5 semaines. Une fois bien enracinées, les boutures sont rempotées dans des pots de 500mL contenant un mélange de tourbe, fibre de coco et perlite (70/20/10, V/V/V) puis sont placées dans un module de serre sur des tables de sub-irrigation, irriguées avec une solution nutritive commerciale (Peter Excel - Scott) (température de 25±5°C, intensité lumineuse ~250±50 µE/m²/s, photopériode en jour long (16h jour/ 8h nuit)). Lorsque le bourgeon de la bouture a débourré et produit un nouvel axe de quelques cm de long (environ une semaine après rempotage), la feuille de bouture (Figure 16 droite) est enlevée délicatement pour limiter le développement de pathogènes. De même, des traitements phytosanitaires sont réalisés régulièrement afin de limiter l’apparition de pucerons, thrips, acariens ou de pathogènes comme l’oïdium.

1.2. Culture des rosiers en conditions contrôlées

Lorsque les plantes en serre atteignent un stade “4 feuilles à 5 folioles visibles” au bout de 3 ou 4 semaines, les plantes sont transférées en chambre de culture où les conditions de culture sont maîtrisées (Figure 17). Dans ces chambres, la température est fixée à 22°C, l’hygrométrie à 70%, les plantes sont placées sous des rampes LED de lumière blanche avec un PPFD d’environ 250 µmol.m-2.s-1 (Figure 18). Les plantes sont laissées en acclimatation jusqu’à atteindre le stade “bouton floral visible” (BFV) (3-4 jours) (Figure 17), stade où la plante sera décapitée. Cette étape de culture permet une homogénéisation des plantes car les bourgeons axillaires sont tous encore dormants avant l'ouverture du bouton floral, sous l'effet de la dominance apicale imposée par l’apex. La décapitation permettra de synchroniser le débourrement des bourgeons distaux chez toutes les plantes.

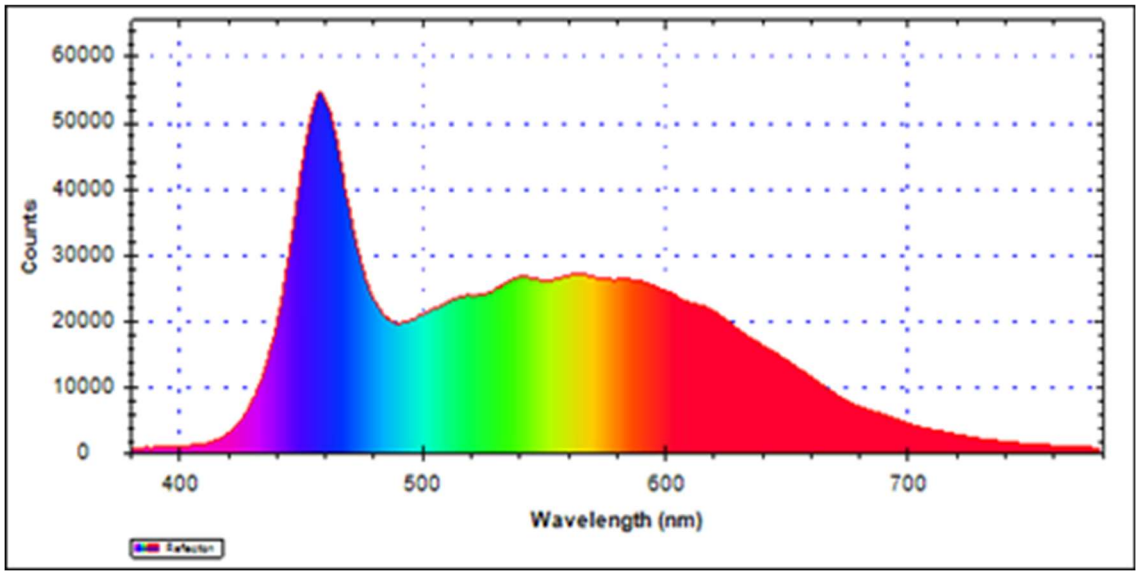

Figure 18 : **Spectre lumineux mesuré dans la chambre de culture à l'aide d'un spectroradiomètre Rainbow-light, MR-16**.

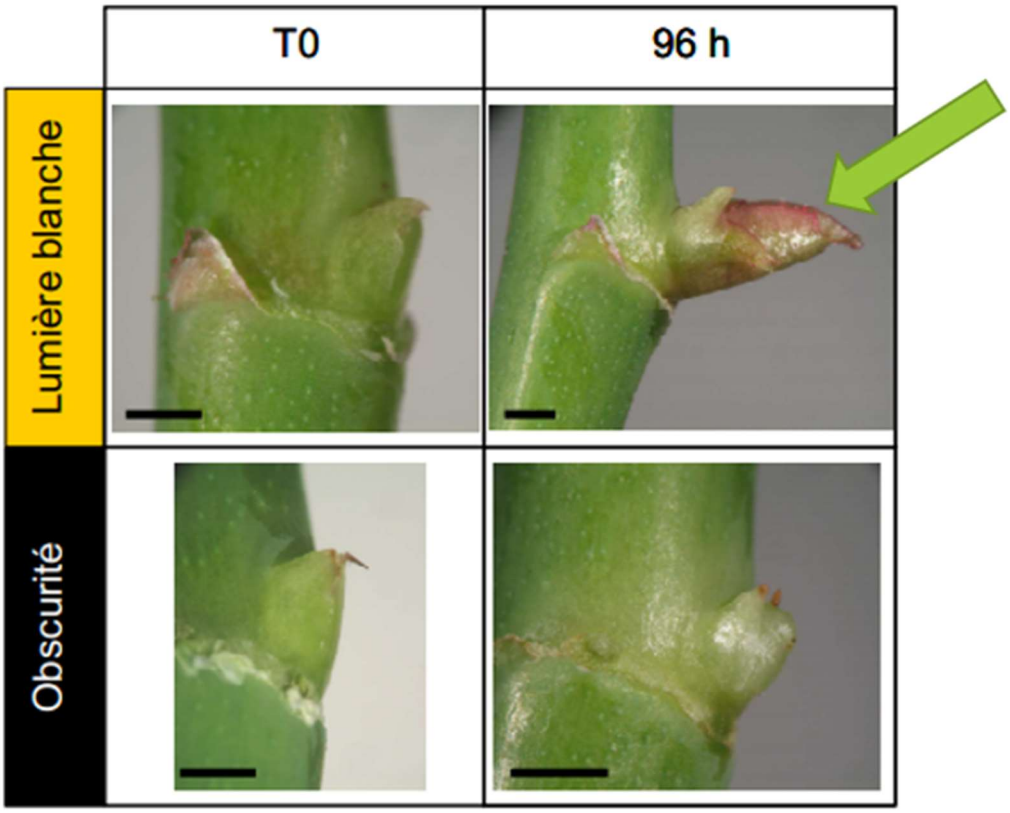

Figure 19 : **Observation du débourrement ou non du bourgeon distal de *Rosa* 'Radrazz' après décapitation et culture à la lumière ou à l'obscurité.** Selon Girault, 2009 et Girault et al., 2008. Barre d'échelle : 1mm.

1.3. Culture d'*Arabidopsis thaliana*

Les plantes utilisées pour les lignées transgéniques sont issues de l'écotype Col-0. Les mutants *jawD* (Palatnik et al., 2003), *35SmiR396b* (Rodriguez et al., 2010) sont des sur-expresseurs des miARNs 319 et 396 respectivement. *soj8* (Rodriguez et al., 2010) porte une mutation sur le site de fixation de miR319 du gène *TCP4* endogène, la rendant moins sensible à l'action du miARN. *MIM396* surexprime une construction "Mimicry" piégeant et inactivant partiellement miR396 (Debernardi et al., 2012). *rGRF2* (Rodriguez et al., 2010) est une lignée transgénique portant un gène GRF2 résistant au miARN, le site de fixation du miR396 étant muté. Ces lignées ont été gracieusement fournies par Mr Javier Palatnik (Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire de Rosario en Argentine). Les plantes d'*Arabidopsis thaliana* ont été semées et cultivées en serre en jour long (photopériode avec 16h jour et 8h nuit) avec une consigne de température de 21°C et une humidité relative de 60%.

2. Modèle d'étude sur plantes décapitées

2.1. Levée de la dominance apicale par décapitation

Une fois le stade "BFV" atteint, les plantes sont décapitées à l'aide d'une lame de rasoir, environ 1cm au-dessus du 4ème bourgeon situé à l'aisselle d'une feuille à 5 ou 7 folioles, afin de supprimer la dominance apicale et de permettre le débourrement synchronisé des bourgeons distaux entre toutes les plantes d'un même lot. Cette décapitation représente le point de contrôle "t0" pour la suite des expériences.

Le bourgeon est considéré comme débourré dès l'apparition d'un primordium foliaire sortant des écailles (Flèche verte, Figure 19).

2.2. Études sur un bourgeon médian

Les bourgeons situés à l'aisselle des feuilles comprenant 5 à 7 folioles sont notés de 1 à 4, du plus basal au plus apical. Les expériences ont essentiellement porté sur le bourgeon n°3 mais tous les bourgeons de 1 à 4 ainsi que leurs nœuds associés ont été récoltés.

Nous nous sommes intéressés au bourgeon n°3 car nous avons tout d'abord étudié le bourgeon n°4 mais nous nous sommes rendu compte que ce bourgeon était proche des bourgeons sylleptiques et ne serait peut-être pas tout à fait dormant. De même, nous avons réalisé des PCR quantitative sur l'expression de gènes dont l'expression était bien caractérisée chez le rosier et ces gènes n'avaient pas du tout le même profil d'expression connu chez les bourgeons numéro 4 alors que chez le bourgeon 3, nous retrouvions le profil d'expression connus.



Figure 20 : **Rosiers sous sac transparent (à gauche) ou sous sac obscure (droite).** Photo : Julie Mallet.

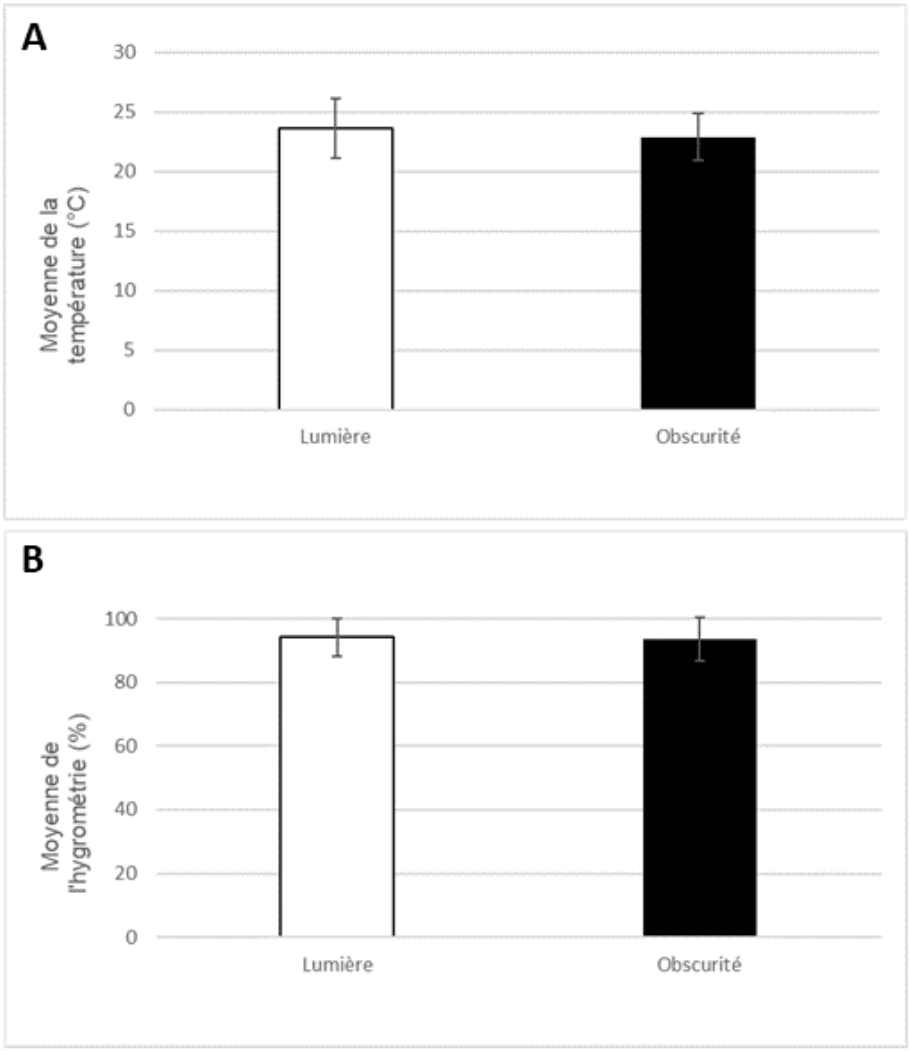

Figure 21 : **Suivi de la température (A) et de l'hygrométrie (B) sous des sachets transparents ou opaque pendant 96h en chambre environnementale.**

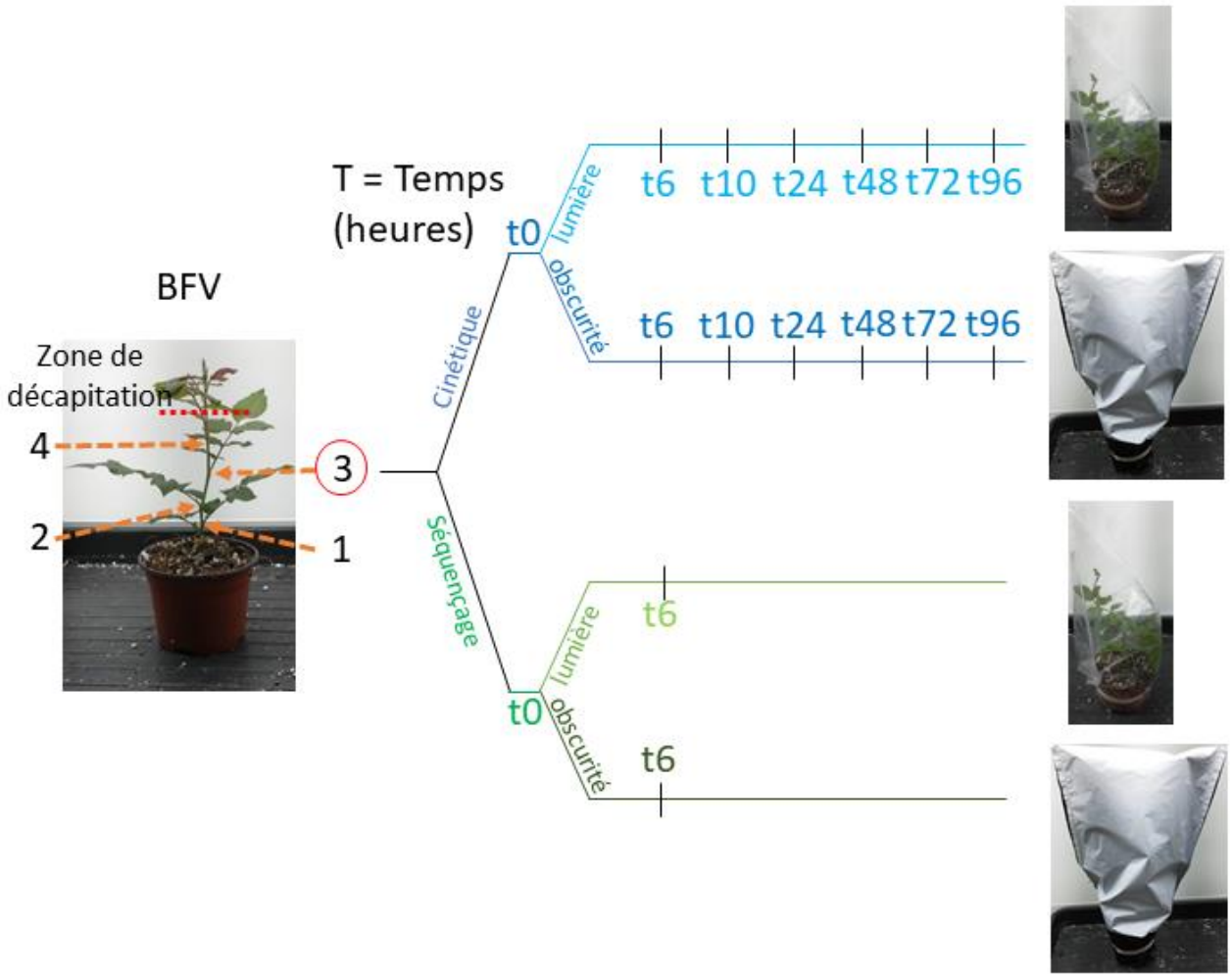

Figure 22 : **Plan d'expériences et prélèvements des bourgeons sur rosier cultivés en chambre de culture.** Le rosier *Rosa* 'Radrazz' est utilisé pour toutes les expériences au stade bouton floral visible (BFV). Les bourgeons axillaires sont numérotés du plus basal (n°1) au bourgeon apical (n°4). Nous avons déterminé la zone de décapitation à environ 0.5cm au-dessus du 4ème bourgeon. Une fois décapitée, les plantes sont placées soit à la lumière sous sachet transparent soit à l'obscurité sous sachet opaque. Des récoltes d'échantillons (bourgeons, tiges, feuilles) ont été réalisées lors de la décapitation puis à 6h après décapitation pour le séquençage, ainsi que sur une cinétique plus longue à 6h, 10h, 24h, 48h, 72h et 96h après décapitation.

2.3. Traitements lumineux des plantes décapitées

Les plantes sont placées soit sous sachet transparent pour la condition “lumière” ou sous sachet opaque pour la condition “obscurité” afin d’étudier l’effet de la lumière sur le débourrement (Figure 20). Des études préliminaires ont été réalisées avec un sac transparent et ont montré que la présence du sac n’empêche pas le débourrement des bourgeons et que ce débourrement reste identique en termes de fréquence et de durée avec ou sans sac transparent (Girault et al., 2008). La validation de nos conditions expérimentales sur le bourgeon 3 est détaillée en Annexe 1.

2.4. Validation des conditions de culture en terme de température et hygrométrie sous les sachets

Afin de valider si les conditions de température et d'hygrométrie restent égales sous le sachet transparent et le sachet opaque, des sondes ont été placées sous les sachets au pied des plantes afin de mesurer la température et l’hygrométrie pendant 96 heures (Figure 21).

Les graphiques représentent la moyenne des températures (Figure 21 A) et d’hygrométrie (Figure 21 B) au bout de 96 heures après avoir placé les plantes sous les sachets. On ne voit aucune différence statistique (deux capteurs par condition lumineuse sur deux plantes différentes, t.test, $p \leq 0.05$) entre la température moyenne et l’hygrométrie moyenne sous le sachet transparent comparé aux conditions sous sachet opaque.

2.5. Cinétique et prélèvements d’échantillons

Différents échantillons sont récoltés au cours du temps après la décapitation pour chaque condition lumineuse afin d’étudier les variations d’expression géniques durant le débourrement sous différentes conditions lumineuses. Les bourgeons sont récoltés à la lame de scalpel et plongés directement dans de l’azote liquide. Pour les échantillons ayant reçu un traitement à l’obscurité, les échantillons sont récoltés dans une salle noire sous lumière verte afin de stimuler le moins possible les plantes. Les échantillons sont conservés à -80°C avant leur utilisation.

Les récoltes en cinétique ont été effectuées à la décapitation effectuée toujours à la même heure de la journée à 10 heures du matin (t0) puis après 3, 6, 10, 24, 48, 72 et 96h en condition de culture à la lumière ou à l’obscurité sur 10 plantes en trois réplicats biologiques. Ces échantillons ont été utilisés pour étudier l'expression de gènes ou de miARNs tout au long de la cinétique de débourrement.

Pour le séquençage des ARNm et petits ARNs, les bourgeons ont été récoltés à la décapitation (t0) et à 6h après décapitation à la lumière et à l’obscurité sur 25 plantes avec trois réplicats biologiques (Figure 22).

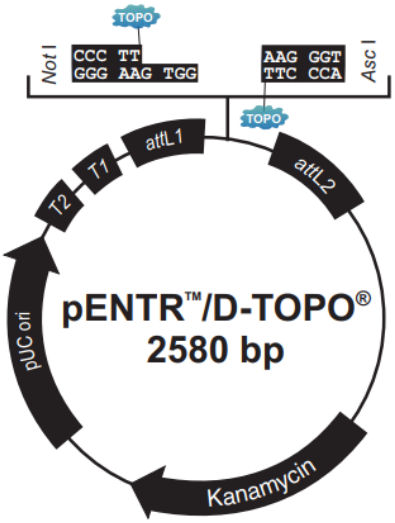

Figure 23 : **Carte du vecteur de clonage pENTR/D-TOPO (ThermoFisher)**

3. Constructions moléculaires

3.1. pENTR

Le vecteur pENTR-TOPO (Thermo Fisher) est utilisé pour le séquençage, la multiplication et la conservation des fragments de gènes isolés en tant que vecteur d'entrée dans une stratégie de clonage de type Gateway (Figure 23). Ce plasmide permet l'insertion directe d'un produit PCR dans le plasmide. Il contient un gène de résistance à la kanamycine.

3.2. pMDC32

Le vecteur pMDC32 est un vecteur binaire contenant un promoteur 35S avec un double « enhancer », ainsi qu'un gène de résistance à l'hygromycine portés par l'ADN-T. Il porte une résistance à la kanamycine pour les procaryotes. (Figure 24).

4. Clonage de type Gateway

4.1. Souches bactériennes

4.1.1. Escherichia coli

La souche d'*Escherichia coli* (*E. coli*) TOP 10 dont le génotype est : F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG a été utilisée pour l'amplification des plasmides

4.1.2. Agrobacterium tumefaciens

La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 a été utilisée pour la transformation stable de plantes d'*Arabidopsis thaliana* et pour l'expression transitoire de protéines recombinantes dans des feuilles de *Nicotiana benthamiana*. Cette souche contient le gène de résistance à l'antibiotique rifampicine sur son chromosome ainsi que le gène de résistance à la gentamicine sur son plasmide Ti portant les gènes nécessaires à la transformation des plantes.

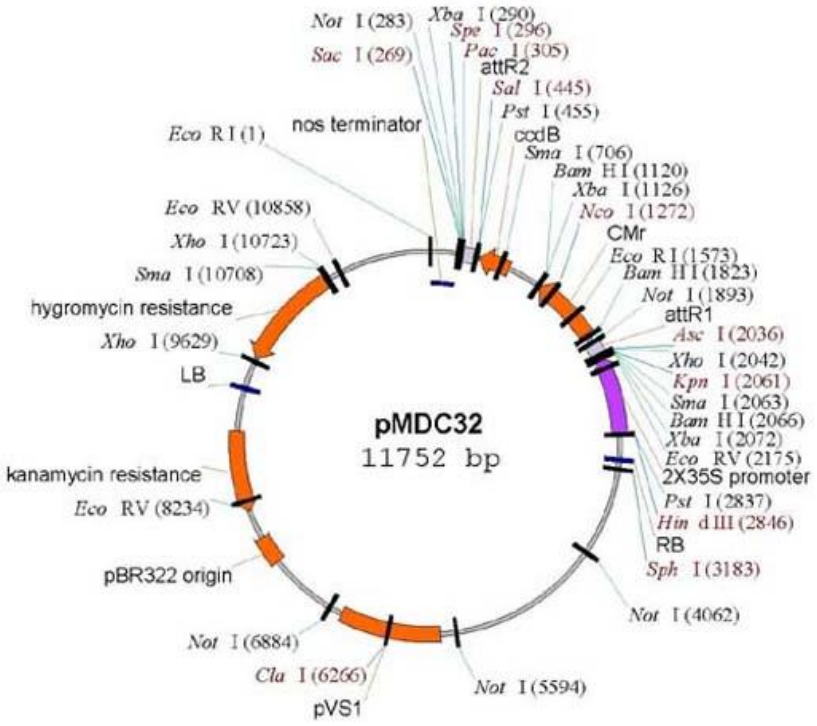

Figure 24 : **Carte du vecteur de clonage pMDC32**

4.1.3. Transformation des E. coli

Tous les fragments d'intérêt portant en amont une séquence CACC permettant d'être clonés directement dans le vecteur pENTR, ont été synthétisés par PCR avec la polymérase Phusion (Thermo Scientific) qui a un taux d'erreur de synthèse plus réduit que la GoTaq Polymérase "classique", puis ont été clonés dans le plasmide pENTR-D-TOPO grâce au kit pENTR-D-Topo selon les instructions du kit (Thermo Fisher), à l'exception que la réaction était laissée toute la nuit à température ambiante, afin de générer des vecteurs d'entrée.

Des *E. coli* TOP10 sont ensuite transformés avec les produits de ligation par choc thermique (20 minutes sur glace, 30 sec à 42°C puis 5 min sur glace). Après récupération à 37°C pendant une heure, les bactéries sont étalées sur boîte avec du LB solide avec pour sélection de la kanamycine à 50µg/ml et incubées à 37°C toute une nuit.

Les clones issus de la culture sont ensuite analysés par PCR, les plasmides des clones positifs sont extraits grâce au kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fabricant. Les plasmides extraits sont ensuite envoyés à séquencer à la société Genewiz afin de savoir si le fragment d'intérêt est bien cloné dans le plasmide pENTR.

Une fois les séquences confirmées, les clones d'entrées sont transférés dans les vecteurs de destination grâce au kit Gateway LR Clonase II enzyme mix (Invitrogen) selon les recommandations du constructeur, la réaction étant réalisée sur une nuit à température ambiante. Le produit de réaction LR est ensuite transformé dans *E. coli* TOP10 par choc thermique et les bactéries sont étalées sur boîte avec du LB solide en présence de kanamycine à 50µg/ml et incubées à 37°C toute une nuit. Les clones résultants de l'incubation sont testés par PCR et les plasmides sont extraits des clones positifs grâce au kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) selon les recommandations du constructeur. Les plasmides extraits sont ensuite envoyés à séquencer à la société Genewiz afin de savoir si le fragment d'intérêt est bien inséré dans le vecteur de destination.

4.1.4. Transformation d'*Agrobacterium tumefaciens*

Une fois les vecteurs de destination prêts, ces vecteurs sont transformés dans *Agrobacterium tumefaciens* par choc thermique ou électroporation. Après récupération à 28°C pendant environ deux heures, les bactéries sont étalées sur boîte LB solide contenant de la rifampicine à 10µg/ml, gentamicine à 10µg/ml et kanamycine à 50µg/ml et sont incubés à 28°C pendant 48 heures.

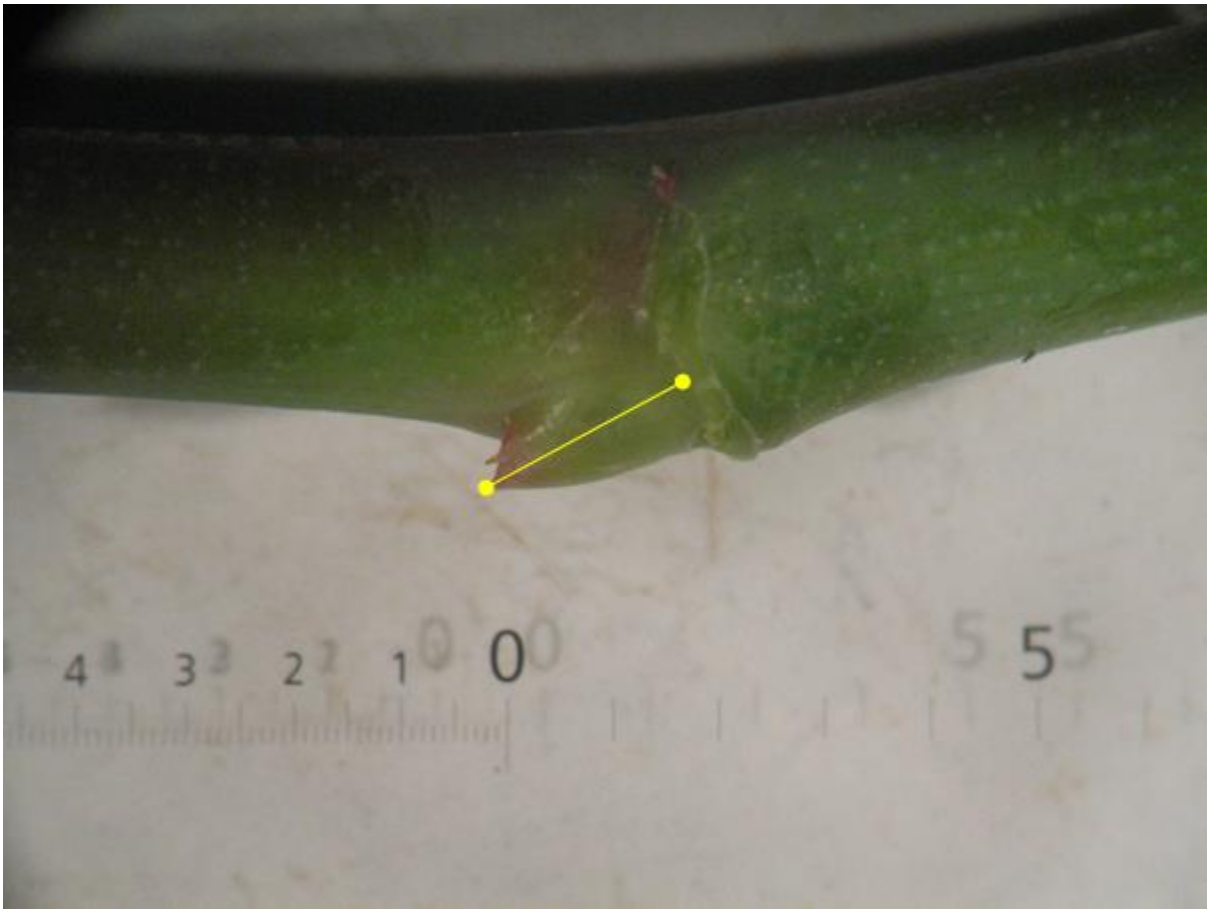

Figure 25 : **Bourgeon vu sous une loupe binoculaire.** Le trait jaune est tracé via le logiciel ImageJ afin de déterminer la longueur du bourgeon.

5. Obtention de plantes transgéniques d'*Arabidopsis*

La transformation des plantes d'Arabidopsis thaliana avec les vecteurs de surexpression de pre-miARN de rosier est réalisée selon le protocole dit de "floral dip" de Clough et Bent (1998).

Les transformants primaires sont sélectionnés in vitro en présence de 16µg/L d'hygromycine sur milieu gélosé (Rosspopoff et al., 2017) en jour long (16h de lumière à 140 µmol/m²/s et 8h de nuit) et une consigne de température de 21°C.

Au bout de 2 semaines, les plantes résistantes (qui se développent bien) sont repiquées en pots de terreaux et cultivées en serre jusqu'à récolte des graines.

Les graines de la génération suivante (T2) sont récoltées, stérilisées et semées sur milieu sélectif afin de déterminer le nombre de loci d'insertion de l'ADN-T et sur milieu sans agent sélectif pour visualiser leur phénotype végétatif. Pour chaque construction, 3 lignées présentant une insertion unique de l'ADN-T et présentant un phénotype fort (avec une ségrégation de 3 plantes résistantes à l'hygromycine pour 1 plante sensible en T2) sont sélectionnées. Puis les graines de la génération suivante sont récoltées, stérilisées et semées sur milieu sélectif afin de déterminer si la lignée sélectionnée est homozygote ou hétérozygote.

6. Analyses phénotypiques

6.1. Suivi de l'élongation du bourgeon et comptage du nombre de pièces foliaires

Le suivi phénotypique des bourgeons est réalisé afin de valider nos conditions expérimentales (sachet transparent et opaque) par rapport à ce qu'il a été montré chez le rosier au laboratoire selon Girault et al., 2008.

Le débourrement est caractérisé par la reprise de l'activité d'organogenèse et d'élongation du bourgeon. L'élongation des bourgeons est calculée à partir de photos prises à l'aide d'un appareil photo placé sur une loupe binoculaire. L'élongation est ensuite calculée grâce au logiciel ImageJ (Figure 25). Une échelle est définie grâce à la règle placée sur la photo, un trait droit est tracé sur un cm de la règle afin de déterminer un nombre de pixel pour un centimètre. Puis une ligne droite est tirée sur le milieu du bourgeon de la tête à la base afin de calculer sa longueur.

Le nombre de pièces foliaires est déterminé en disséquant le bourgeon sous loupe binoculaire en partant des écailles vers le méristème. Nous considérons comme des pièces foliaires les jeunes feuilles préformées dans le bourgeon avant débourrement et les primordia foliaires qui sont des feuilles à l'état embryonnaire (Girault, 2009).

Dans le cadre de cette thèse, un bourgeon est considéré comme débourré lorsque la pointe de la première feuille préformée sera visible en dehors des écailles (Girault et al., 2008).

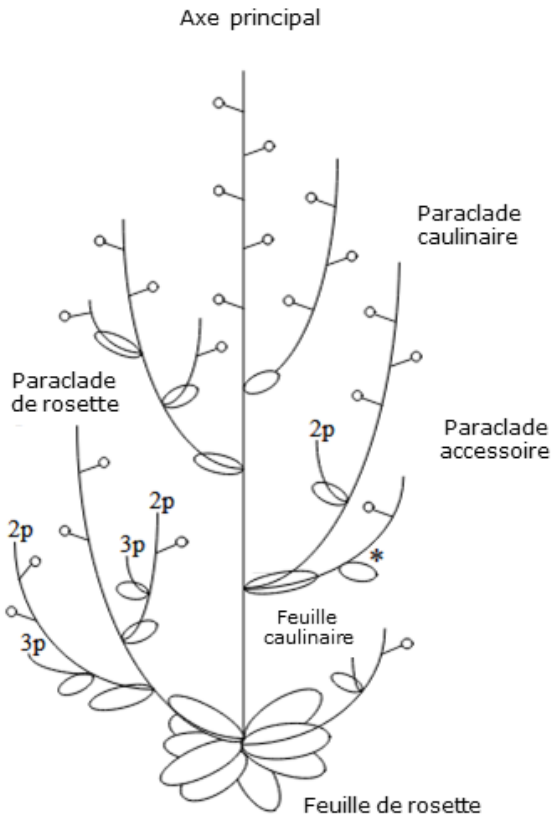

Figure 26 : **Schéma représentant la dénomination des différents axes et organes pour l'analyse phénotypique**. Dessin selon Talbert et al., 1995 (2p : paraclade d'ordre 2 ; 3p : paraclade d'ordre 3).

6.2. Analyse phénotypique des mutants d'*Arabidopsis*

Afin d'étudier le phénotype de ramification des mutants *Arabidopsis*, le nombre de paraclades de rosettes, paraclades secondaires, paraclades caulinaires, nombre de feuilles de rosette, feuilles caulinaire, nombre d'entre-nœuds ont été comptés (Figure 26).

7. Analyses de biologie moléculaire

7.1. Analyse de l'accumulation des transcrits de gènes d'intérêt

7.1.1. Extractions des ARNs totaux à partir de matériel végétal

Les ARNs provenant des bourgeons récoltés ont été extraits grâce à la méthode décrite par Barbier et al., (2019). Ce protocole est adapté aux espèces récalcitrantes comme le rosier et nécessite peu de matériel biologique. Le protocole détaillé est situé en Annexe 2.

Le matériel biologique est broyé à froid et homogénéisé dans 625µl de tampon CTAB, composé de 2% de CTAB, du NaCl à 1.4M, 20mM d'EDTA et 100mM de TRIS à pH 8, 2% de PVP 40 et $MgCl_2$ 5mM. Après ajout de 25µl de DTT à 0.5M, les échantillons sont incubés à 65°C pendant 15 min. Un ajout de 65µl de SDS à 10% est effectué puis les échantillons sont centrifugés à 20000 g pendant 10 min. La phase aqueuse est alors transférée dans un nouveau tube. Cette phase aqueuse est mélangée avec 400µl d'isopropanol froid (conservé à -20°C) puis les échantillons sont placés à -20°C pendant 15 min. Les ARNs vont précipiter et sont récupérés sous forme de culot après centrifugation à 20000g à 4°C pendant 45 minutes. Les culots sont lavés deux fois à l'éthanol 70% et conservés à -20°C. Les ARNs sont ensuite resuspendus dans 90µl d'eau "Rnase Free" et ensuite un mélange de DNase et de tampon (3µl de DNase et 10µl de tampon) est ajouté. Les échantillons sont ensuite incubés à 37°C pendant 30 min avec agitation toutes les 10 minutes afin de bien ré-homogénéiser la DNase. L'ARN est à nouveau précipité après ajout d'isopropanol et l'ajout de 5µl de NaCl 5M et centrifugé à 20000g à 4°C pendant 45 min. A nouveau, les culots sont lavés deux fois à l'éthanol 70% et solubilisés dans 40µl d'eau "Rnase free". La concentration d'ARN est déterminée grâce à un Nanodrop (Société Ozyme, Thermo Scientific). Leur qualité est également vérifiée après dépôt sur un gel d'agarose à 1% en présence du chélatant "Midori green".

7.1.2. Synthèse des ADN complémentaires (ADNc)

Afin d'étudier des gènes d'intérêt par RT-PCR, la synthèse d'ADNc est réalisée à partir de 500 ng d'ARNs totaux extraits des bourgeons à l'aide du kit Superscript III (Invitrogen).

Les ARNs sont repris dans un volume total de 11µl avec de l'eau RNAse-free. Un mix contenant 1µl de dNTPs 10 mM et 1µl d'oligo dT 50µM est ajouté aux ARNs. Le mélange est incubé à 65°C pendant 5min puis 2 minutes à 4°C.

Puis un deuxième mix contenant 4µl de tampon RT 5X, 1µl DTT 0.1M, 1µl de RNAse out, 1µl de Superscript III est ajouté. Le cycle de réaction RT est ensuite 1 heure à 50°C puis 15 minutes à 70°C. Les ADNc sont stockés à -20°C

7.1.3. Transcription réverse des miARNs

Afin d'obtenir les ADNc des miARNs matures que nous souhaitons étudier, une technique particulière de reverse transcription est employée car les miARNs sont de petites tailles et ne possèdent pas de queue polyA en 3'. La transcription réverse dite "stem-loop" permet la transcription réverse des miARNs matures.

Tout d'abord une amorce dite stem-loop RT est dessinée pour être spécifique des 6 derniers nucléotides du miARN d'intérêt. Cette amorce va s'hybrider au miARN et permettre une transcription réverse. Puis l'ADNc pourra être étudié par qPCR en utilisant comme amorce sens une amorce spécifique du miARN prenant les 15 premiers nucléotides du miARN et une amorce antisens "universelle" qui s'hybride dans l'amorce stem-loop. Le protocole est issu de la publication de Varkonyi & Hellens, 2011.

7.1.4. Conception des amorces pour l'amplification par qPCR de gènes d'intérêt.

Les amorces conçues pour nos expériences ont été dessinées à partir des séquences géniques annotées sur le génome de référence de Rosier (Génome de *Rosa chinensis* ; Hibrand-Saint Oyant et al., 2018). Pour chaque gènes d'intérêt, le CDS (séquence codante) est traitée par le logiciel en ligne PRIMER3plus (https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi) qui utilise comme paramètres : taille de fragment attendu entre 100 et 200pb, longueur des amorces d'environ 20 pb, Tm des amorces environ 60°C et séquences composées entre 40 et 60% de GC. Certaines amorces ont été dessinées lors de précédentes études du laboratoire et ont été soumises à des Blasts sur le génome de référence afin de vérifier qu'elles sont bien spécifiques du gène d'intérêt étudié. Les séquences des amorces utilisées sont disponibles en Annexe 3.

7.1.5. Mesure de l'accumulation des transcrits par PCR quantitative (qPCR) en temps réel

Pour la PCR quantitative, 7µl de SYBR Mix avec 0.6µl de chaque amorce à 10µM (sens et antisens) sont ajoutés à 3µl d'ADNc. Toutes les réactions de PCR sont réalisées sur la machine CFX96 Connect de chez BioRad en trois réplicats techniques avec le programme suivant: 1 cycle à 95°C pendant 5 min, 40 cycles à 95°C pendant 15 secondes et 60°C pendant 15 secondes puis acquisition de la fluorescence. A la fin de l'amplification, une courbe de fusion est réalisée en prenant des mesures de la fluorescence entre 55°C et 95 °C. Le gène UBC (RC7G0173600) est utilisé comme gène de référence pour les qPCR des ARNs messager. Ce gène a été validé comme un bon gène de référence (Han et al., 2012) et déjà validé sur des expériences de bourgeons de rosier (Wang et al., 2019 ; Porcher et al., 2021). Le petit ARN nucléaire U6 est utilisé comme référence pour les qPCR des miARNs, cet ARN est classiquement utilisé comme référence pour l'analyse d'expression de miARNs (Luo et al., 2018 ; Tang et al., 2019). L'analyse d'expression est réalisée par la méthode du ΔΔCt (Pfaffl, 2001).

8. Analyses transcriptomiques à haut débit (ARNm et petits ARNs)

Le séquençage a été réalisé par la société BGI (Beijing Genomics Institute) située à Hong Kong. Le contrôle qualité des échantillons a été réalisé grâce au bio-analyseur Agilent 2100 (Agilent RNA 6000 Nano Kit). La concentration des ARN, les valeurs de RIN (>7.5), le ratio 28S/18S (>1.3) et la distribution des tailles de fragments ont été contrôlés.

8.1. Séquençage à haut débit par la technologie Illumina des ARNm

Les ARNm ont été isolés des ARNs totaux par une méthode oligo(dT) afin de sélectionner les ARNs ayant une queue polyA. Les ARNm sont ensuite fragmentés. Les brins d'ADNc sont ensuite synthétisés par reverse-transcription. Des adaptateurs sont ensuite ajoutés aux fragments ADNc. Les fragments de bonne taille (100 pb) sont sélectionnés pour faire l'amplification PCR. Les bio-analyseurs Agilent 2100 et ABI StepOnePlus Real-Time PCR System sont utilisés pour la quantification et qualification des librairies. Les échantillons ont été séquencés sur la plateforme Illumina HiSeq.

8.2. Séquençage à haut débit par la technologie Illumina des petits ARNs

Les petits ARNs sont séparés, tous les fragments entre 18-30 nucléotides sont filtrés par un gel PAGE. Puis des adaptateurs 3' et 5' sont ajoutés aux extrémités des fragments de petits ARNs. Ensuite les ADNc sont synthétisés par reverse-transcription et sont amplifiés par PCR, ce qui permet un enrichissement des ADNc portant les adaptateurs 5' et 3'. Les produits PCR de taille entre 100-120 paires de bases sont filtrés sur un gel PAGE pour éliminer les dimères d'amorces et autres produits non souhaités. Les échantillons sont séquencés par la technique Illumina grâce à la technologie BGISEQ-500.

9. Analyses bio-informatiques du séquençage des ARNm

9.1. Qualité des lectures (reads)

Nous avons analysé la qualité des reads issus du séquençage grâce à l'outil FastQC (Andrews, 2010 - https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). Le score de qualité des bases (score phred) séquencées permet d'estimer la probabilité d'erreur de séquençage d'une base (par exemple, un score supérieur à 30 indique une probabilité d'erreur de 1 pour 1000 soit une précision d'identification de la base à 99.9%).

9.2. Alignement des reads contre un génome de référence

Nous avons aligné les reads contre le génome de référence *Rosa chinensis* (Hibrand St-Oyant et al., 2018) à l'aide de l'aligneur STAR (Dobin et al., 2013) avec comme changements de paramètres qui sont adaptés au génome du rosier :

--alignIntronMax 10000 --alignMatesGapMax 2500

9.3. Comptage des reads

Le comptage du nombre de reads en fonction de l'annotation du génome pour les transcrits et les ARNs non codants a été réalisé grâce à l'outil featureCounts (Liao et al., 2014).

9.4. Analyse d'expression différentielle

L'analyse d'expression des gènes a été réalisée grâce au package SARTools par la méthode DESEq2 (Varet et al., 2016) sur le logiciel Rstudio (le détail des versions utilisées et paramètres utilisés sont en Annexe 4).

Lors de l'analyse DESeq2, nous exprimons les expressions par les comparaisons condition A vs condition B. Dans ce manuscrit, nous considérons toujours la condition A comme la condition de référence et la condition B comme la condition "traitement". Donc lorsqu'un gène est noté surexprimé dans la comparaison condition A vs condition B, cela signifie qu'un nombre de transcrits significativement plus élevé est détecté dans la condition B. Cette augmentation de transcrits peut traduire soit d'une réelle stimulation de la transcription du gène dans la condition B ou bien une moindre dégradation des transcrits de ce gène.

A titre d'exemple, lors de la comparaison t0vst6L, lorsqu'un gène est considéré comme surexprimé, il est surexprimé dans la condition t6L par rapport à la condition de référence t0.

9.5. Enrichissement des voies (GO et KEGG)

L'enrichissement des voies par Gene Ontology (GO) a été réalisé au laboratoire grâce au package AskoR (Caravalho et al., 2021, https://github.com/asusete/askoR). La recherche des GO chez *Rosa chinensis* a déjà été réalisée par Hibrand St-Oyant et al., 2018, le fichier a été récupéré sur rosaceae.org. Cette liste de GO identifiée chez *Rosa chinensis* a été confrontée à la liste des gènes différentiellement exprimés afin de voir quelles voies étaient enrichies parmi les gènes différentiellement exprimés.

La recherche des voies KEGG (Kyoto Encyclopedia Genes and Genome) a été réalisée grâce au site https://www.genome.jp/kaas-bin/kaas_main (Moriya et al., 2007). Les séquences protéiques des gènes différentiellement exprimés ont été confronté à la base de données *Rosa chinensis* déjà disponible sur le site.

10. Analyses bio-informatiques du séquençage des petits ARNs

10.1. Nettoyage des données

Une partie de l'analyse bio-informatique a été réalisée par la société BGI. Les données sont nettoyées afin d'enlever les reads de mauvaises qualités, les adaptateurs et autres contaminants. Les reads ayant une qualité inférieure à 13 ou ayant une taille inférieure à 18 nucléotides sont retirés. Les adaptateurs 5' et 3' sont retirés. Un diagramme de distribution de tailles des tags est réalisé.

10.2. Alignement des lectures, réalisé par la société BGI

L'outil Bowtie est utilisé pour aligner les reads propres contre des bases de données de références. Ici, les reads ont été alignés contre la base de données Rfam (https://rfam.xfam.org/ Nawrocki et al., 2015) et contre le génome de référence *Rosa chinensis* (Hibrand St-Oyant et al., 2018) afin de voir la répartition des petits ARNs le long du génome.

10.3. Prédiction des petits ARNs, réalisé par la société BGI

L'outil RIPmiR (Breakfield et al., 2012) a été utilisé pour prédire les miARNs (nouveaux et conservés) en cherchant la structure tige boucle caractéristique des précurseurs de miARN.

Les petits ARN interférents (siARN) sont des ARNs double brin de 22-24nt, avec des extrémités 3' simple brin dépassant de 2 nucléotides. En raison de cette caractéristique structurelle, les fragments sont alignés les uns sur les autres pour trouver des petits ARNs répondant à ces critères. Ces tags résultants sont les plus susceptibles d'être des candidats siARN.

10.4. Analyse d'expression,

Nous avons réalisé l'analyse d'expression des petits ARNs, qui a été effectuée grâce au package SARTools sur le logiciel Rstudio (le détail des versions utilisées et paramètres utilisés sont en Annexe 5).

10.5. Prédiction des cibles

Afin de déterminer les potentiels gènes ciblés par des miARNs, le logiciel psRNATarget a été utilisé (https://www.zhaolab.org/psRNATarget/analysis ; Dai et al., 2018). Ce logiciel se base sur la complémentarité des séquences plus ou moins “parfaite” entre miARNs et gène. Il se base également sur l’accessibilité de l’ARNm cible ainsi que l’énergie nécessaire pour ouvrir la structure secondaire de l’ARNm autour du potentiel site cible du miARN. Lors de l’analyse, un score dit “d’attente maximale” (maximal expectation en anglais) est établi, calculé sur des pénalités dues à de potentiels décalages entre la séquence du miARN et de la possible séquence cible. Plus le score est élevé, plus il y a de pénalités. Les paramètres généraux ont été utilisé sauf pour le score maximal établi à 3 car même s’il est possible de trouver de potentielles cibles avec un score de 5, il est fort probable de trouver des “faux-positifs” avec un score entre 3 et 5 donc nous garderons les résultats ayant un score inférieur ou égal à 3.

11. Analyses statistiques

Afin de savoir si des tests paramétriques ou non paramétriques doivent être utilisés, une analyse de normalité (test de Shapiro) et homoscédasticité des variances (test de Bartlett) sont réalisés. Si l’hypothèse de normalité et l'homoscédasticité des variances sont validées, alors une analyse multivariées ANOVA est réalisée suivi d’un test post-hoc d’une comparaison deux à deux par le test de Student ($p\text{-value} \leq 0.05$).

Sinon, des tests non-paramétriques sont réalisés avec une analyse multivariée réalisée grâce au test de Kruskall-Wallis et une comparaison deux à deux par le test de Wilcoxon ($p\text{-value} \leq 0.05$). Ces analyses ont été effectuées sous le logiciel Rstudio.

Résultats

Chapitre I : Etude du transcriptome des phases précoces du débourrement en réponse à la lumière

1. Introduction

Comme mentionné en introduction, beaucoup de connaissances ont été apportées par l'équipe ARCH-E de l'IRHS dans l'étude des régulations transcriptionnelles impliquées dans le photo-contrôle du débourrement chez le rosier (Girault et al., 2008 ; Girault et al., 2010 ; Henry et al., 2011 ; Choubane et al., 2012 ; Rabot et al., 2012 ; Rabot et al., 2014, Djennane et al., 2014 ; Barbier et al., 2015 ; Roman et al., 2016 ; Roman et al., 2017 ; Porcher et al., 2020 ; Porcher et al., 2021) (Figure 10). En particulier, l'étude de gènes candidats a montré que certains gènes sont fortement différentiellement exprimés et photo-régulés dès 6 heures après la décapitation. Par exemple, un gène codant pour la NAD-SDH (*NAD-DEPENDANT SORBITOL DEHYDROGENASE)* est induit à l'obscurité et réprimée à la lumière, 6 heures après décapitation (Girault et al., 2010 ; Roman et al., 2016). A l'inverse, le gène *RhEXPA3,* codant une expansine, est induit 6 heures après décapitation dans des bourgeons de plantes cultivées à la lumière (Roman et al., 2016). L'activation de l'expression de ce gène expansine s'accompagne d'une reprise de l'expansion et des transitions de la phase G1 à la phase S dès 6 heures après décapitation (Roman et al., 2016 ; Roman et al., 2017). Ces résultats indiquent qu'il existe une régulation transcriptionnelle précoce du débourrement par la lumière et que certains processus cellulaires conduisant au débourrement sont déjà enclenchés.

Par ailleurs, des travaux réalisés chez d'autres espèces montrent la mise en place d'autres processus clé du débourrement dans les quelques heures qui suivent la décapitation. Ainsi, une forte production d'auxine accompagnée d'une diminution de la quantité d'ABA sont observées dans le bourgeon de pois 4 heures après décapitation (Gocal et al., 1991). De même, 6 heures après décapitation, la relocalisation des protéines PIN1 sur la membrane cellulaire est observée permettant l'export de l'auxine hors du bourgeon de pois (Balla et al., 2011). Également, la teneur en cytokinines augmente fortement dans les bourgeons axillaires de pois chiche dès 6 heures après la décapitation (Turnbull et al., 1997). Chez le chrysanthème, Sun et al. (2021) ont mis en évidence l'implication de l'auxine, des cytokinines, des jasmonates et des sucres dans les phases précoces du débourrement 6 heures après décapitation.

L'ensemble de ces travaux suggèrent donc que les régulations hormonales ainsi que des processus de division et d'expansion cellulaire sont engagées très précocement après la décapitation de la tige au sein des bourgeons axillaires.

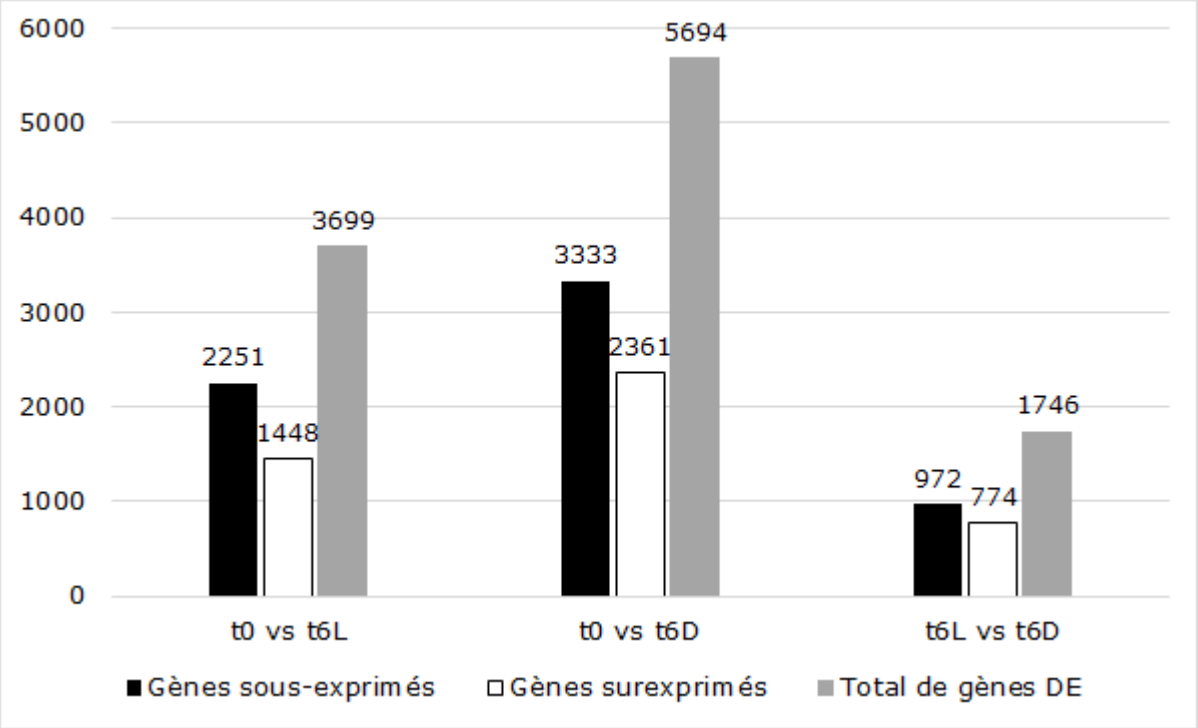

Figure 27 : **Nombre de gènes différentiellement exprimés dans les bourgeons 6h après décapitation et selon les conditions d'éclairement.** Analyse DESeq2 (Log2 Fold change > ou < 0 et p-value≤0.05). DE pour différentiellement exprimé. Les barres noires représentent les gènes sous-exprimés dans la comparaison étudiée, les barres blanches les gènes surexprimés et les barres grises le nombre total de gènes différentiellement exprimés dans la comparaison. La notation t0 vs t6L indique que les échantillons t6L ont été comparés à t0 pris comme référence. Ainsi, par exemple 2251 gènes sont sous-exprimés à t6L par rapport à t0.

Dans ce chapitre, nous avons pour objectif d'identifier de nouveaux gènes et voies de régulation impliquées dans les phases initiales du débourrement du bourgeon *in planta* en réponse au facteur lumière chez le rosier. En se basant sur les travaux déjà réalisés par l'équipe, nous avons donc choisi le temps 6h après la décapitation pour cette étude. Nous avons exploré la population d'ARNm présents dans les bourgeons par une approche sans *a priori.* Jusqu'ici, chez le rosier, des analyses transcriptomiques à l'échelle du génome entier des bourgeons ont été réalisées sur l'effet antagoniste du sucre et de l'auxine sur le débourrement (Wang et al., 2021a) ainsi que sur l'effet du nitrate et du saccharose sur le débourrement (Thèse Marie-Anne Le Moigne 2018). Ces deux études ont été réalisées sur des bourgeons cultivés *in vitro* récoltés après 24 heures de traitement. Notre étude se distingue donc de ces travaux car des bourgeons prélevés *in planta* seront étudiés ici et que nous nous intéressons à un temps plus précoce afin d'identifier de nouveaux gènes et voies de régulation impliquées dans les phases initiales du débourrement du bourgeon en réponse au facteur lumière.

2. Résultats

Afin d'identifier les gènes impliqués dans les processus précoces (6h) du photo-contrôle du débourrement, des bourgeons axillaires ont été prélevés sur des plants de rosiers décapités au stade "Bouton Floral Visible" (BFV). La décapitation a été appliquée au-dessus du bourgeon numéro 4 et les plants ont ensuite été placés sous sac transparent pour la condition lumière et sous sac opaque pour la condition obscurité (Figure 20). Six heures après la décapitation, les bourgeons numéro 3 ont été récoltés et les ARNs totaux extraits et séquencés comme décrits dans le chapitre Matériels et méthodes (Partie 2.5.). La décapitation nous permet de lever la paradormance de manière synchronisée et de permettre l'étude de l'écodormance.

2.1. Analyse d'expression différentielle

Afin d'étudier le différentiel d'expression des gènes dans le bourgeon exposé à la lumière ou à l'obscurité, un comptage du nombre de lectures s'alignant sur le génome et une analyse d'expression différentielle (DESeq2 ; Love et al., 2014) ont été réalisés.

L'analyse DESeq2 montre qu'il y a 3699 gènes différentiellement exprimés 6 h après la décapitation chez des plantes exposées à la lumière (t6L) par rapport au temps juste après la décapitation de la tige (t0), dont 61% sont sous-exprimés à t6L par rapport à t0 et 39% surexprimés à t6L (Figure 27). Cela indique que la lumière a un effet répresseur important sur la transcription d'un grand nombre de gènes.

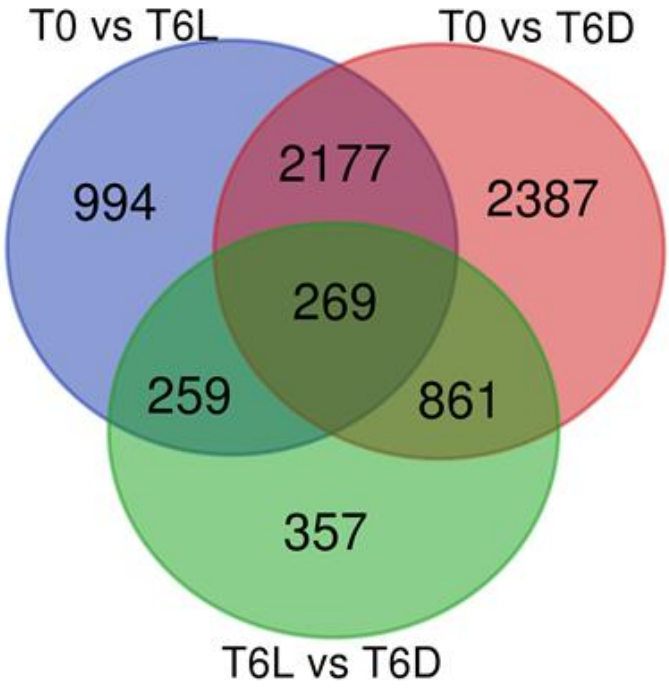

Figure 28 : **Diagramme de Venn représentant le nombre de gènes différentiellement exprimés dans les bourgeons 6h après décapitation et selon les conditions d'éclairement.** Condition de référence vs condition "traitement". La notation t0 vs t6L indique que les échantillons t6L ont été comparés à t0 pris comme référence.

Pour la comparaison plantes exposées à l'obscurité (t6D) par rapport au moment juste après décapitation (t0), 5694 gènes sont différentiellement exprimés dont 58% sous-exprimés et 42% surexprimés à t6D. Il y aurait donc un plus grand nombre de gènes différentiellement exprimés à l'obscurité et plus particulièrement un plus grand nombre de gènes réprimés à l'obscurité.

Enfin, entre t6L et t6D, 1746 gènes sont différentiellement exprimés dont 56% sous-exprimés et 44% surexprimés à l'obscurité par rapport à la condition lumière (t6L) (Figure 27). Il y aurait donc un plus grand nombre de gènes réprimés à l'obscurité par rapport à la condition lumière (t6L).

Les comparaisons t0 vs t6L et t0 vs t6D montrent le plus grand nombre de gènes différentiellement exprimés, ce qui illustre une forte réponse à la décapitation des bourgeons comme observée dans une étude précédente (Roman et al., 2016).

Nous avons tout d'abord réalisé un diagramme de Venn avec les gènes différentiellement exprimés (en ne distinguant pas les gènes activés ou réprimés) dans nos trois comparaisons (t0 vs t6L, t0 vs t6D et t6L vs t6D) afin de discerner les gènes pouvant refléter un effet décapitation (gènes en commun t0 vs t6L et t0 vs t6D) ou bien un effet de la condition d'éclairement (Figure 28).

La Figure 28 nous permet de dénombrer au total 7304 gènes s'exprimant différentiellement dans au moins une comparaison entre les bourgeons lors de la décapitation et 6h plus tard, que ce soit à la lumière ou à l'obscurité. Ces 7304 gènes différentiellement exprimés représentent 16.4% du génome de *Rosa* chinensis (44481 gènes annotés).

Une partie de ces gènes (2446 gènes 2177+269 gènes soit 33.4% des gènes DE) sont différentiellement exprimés à 6h après décapitation, quel que soit la condition d'éclairement par rapport à la décapitation (t0). Ces gènes qui sont à la fois différentiellement exprimés entre les comparaisons t0 vs t6L et t0 vs t6D peuvent être soit régulés de la même façon entre les deux comparaisons (soit activés, soit réprimés) ou bien avoir des régulation opposées (activés dans un cas réprimés dans l'autre). Afin d'identifier ces différentes populations de gènes, nous avons réalisé un diagramme de Venn comparant les gènes surexprimés ou réprimés selon la condition d'éclairement 6 heures après décapitation, par rapport au moment juste après décapitation (t0) (Figure 29).

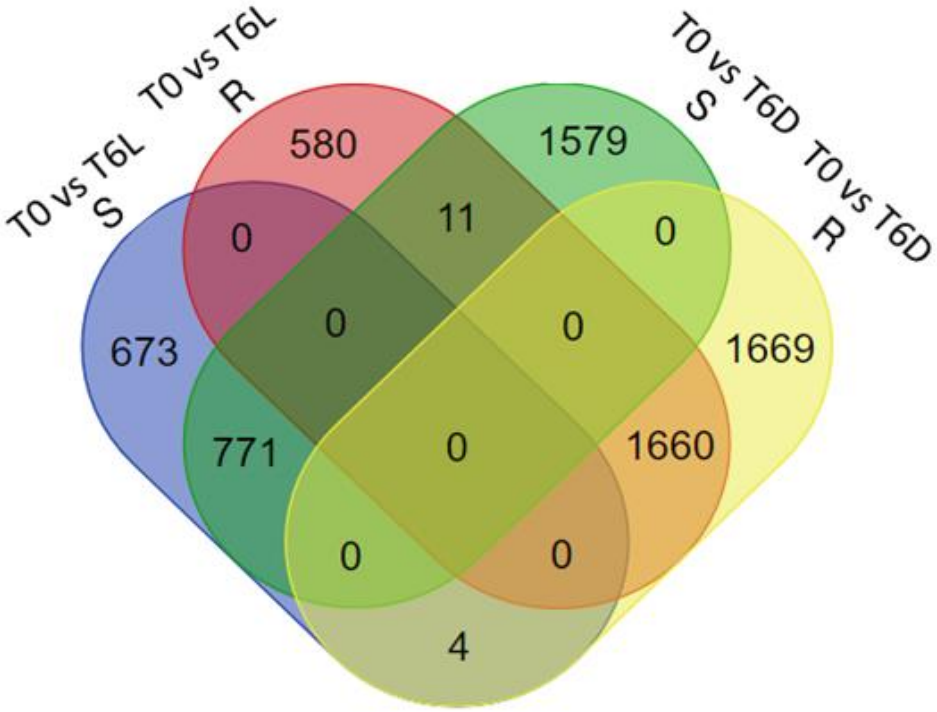

Figure 29 : **Diagramme de Venn représentant les gènes surexprimés ou réprimés dans les bourgeons entre le moment de la décapitation (t0) et après 6 heures d'exposition à la lumière ou l'obscurité.** S signifie surexprimés par rapport à la condition de référence (t0) et R signifie réprimé par rapport à la condition de référence (t0).

Gènes présentant la même dynamique d'expression quelle que soit la condition lumineuse

La Figure 29 nous permet de dénombrer 6947 gènes s'exprimant différentiellement dans les bourgeons lors de la décapitation et 6h plus tard que ce soit à la lumière ou à l'obscurité. Une partie de ces gènes (771 soit 11%) sont surexprimés à 6h après décapitation quelle que soit la condition d'éclairement par rapport à la décapitation (t0). De la même manière, 1660 (23,9%) de ces gènes sont sous-exprimés à 6h après décapitation quelle que soit la condition d'éclairement par rapport à la décapitation (t0). Ces 2431 (771+1660) gènes qui présentent la même évolution de leur expression quelle que soit la condition lumineuse pourraient donc avoir une expression régulée par la décapitation commune aux deux conditions. Alternativement, ils pourraient également correspondre à des gènes dont l'expression dépend du rythme circadien. En effet, les échantillons t6L et t6D ont en commun d'avoir été prélevés 6h après les échantillons t0. Ces 2431 gènes résultent probablement de l'addition des 2 effets que nous ne pouvons pas distinguer avec nos analyses.

Afin d'étudier si ce groupe de gènes a une distribution significative par rapport à ce qui est dû au hasard, nous avons réalisé une étude d'enrichissement de ces gènes communs entre la condition lumière et la condition obscurité par un test de distribution hypergéométrique (Tableau II). Ce test est "un test d'hypothèse nulle qui évalue si une variable aléatoire suit une distribution hypergéométrique. C'est un test de qualité de l'ajustement à cette distribution" (Xiang et al., 2011 ; http://purl.obolibrary.org/obo/STATO_0000285). Nous pouvons observer que la p-value générée par le test est très basse et inférieure à 0.05. Cette valeur indique un enrichissement des gènes simultanément surexprimés (respectivement réprimés) dans les deux comparaisons t0 vs t6L et t0 vs t6D par rapport à ceux surexprimés (respectivement réprimés) dans chaque condition. Une part importante des différences de transcriptome est donc commune aux 2 conditions et ne dépend pas de la condition d'éclairement. Ces gènes constituent donc un premier groupe de gènes d'intérêt pour l'étude plus approfondie de l'impact de la décapitation et du cycle circadien au cours du débourrement des bourgeons de rosier.

Gènes présentant une dynamique d'expression régulée par la condition lumineuse

Nous nous sommes, dans un deuxième temps, intéressés aux gènes dont l'expression est strictement contrôlée par les conditions d'éclairement. Le diagramme de Venn (Figure 29) montre que 673 gènes (9.6% des 6947) sont surexprimés et 580 (8.3%) sont réprimés 6h après exposition à la lumière en comparaison à t0. En complément, 1579 (22.7%) gènes sont surexprimés et 1669 (24%) gènes sont réprimés après 6h à l'obscurité. Cela constitue un pool de 4501 gènes dont l'expression est fortement sous contrôle des conditions d'éclairement au cours des phases précoces du débourrement, en dehors de tout effet de la décapitation et du cycle circadien.

Tableau II : **Test d'enrichissement des gènes entre deux comparaisons des conditions utilisées pour le séquençage.**

Comparaisons	p-value
Gènes induits t0 vs t6L et Gènes induits t0 vs t6D	<6.719293e-322
Gènes réprimés t0 vs t6L et Gènes réprimés t0 vs t6D	<9.090808e-322

Tableau III : **Test d'appauvrissement des gènes entre deux comparaisons des conditions utilisées pour le séquençage.**

Comparaisons	p-value
Gènes t0vst6L induits vs t0vs t6D réprimés	3.56e-37
Gènes t0vst6L réprimés vs t0vs t6D induits	5.5e-42

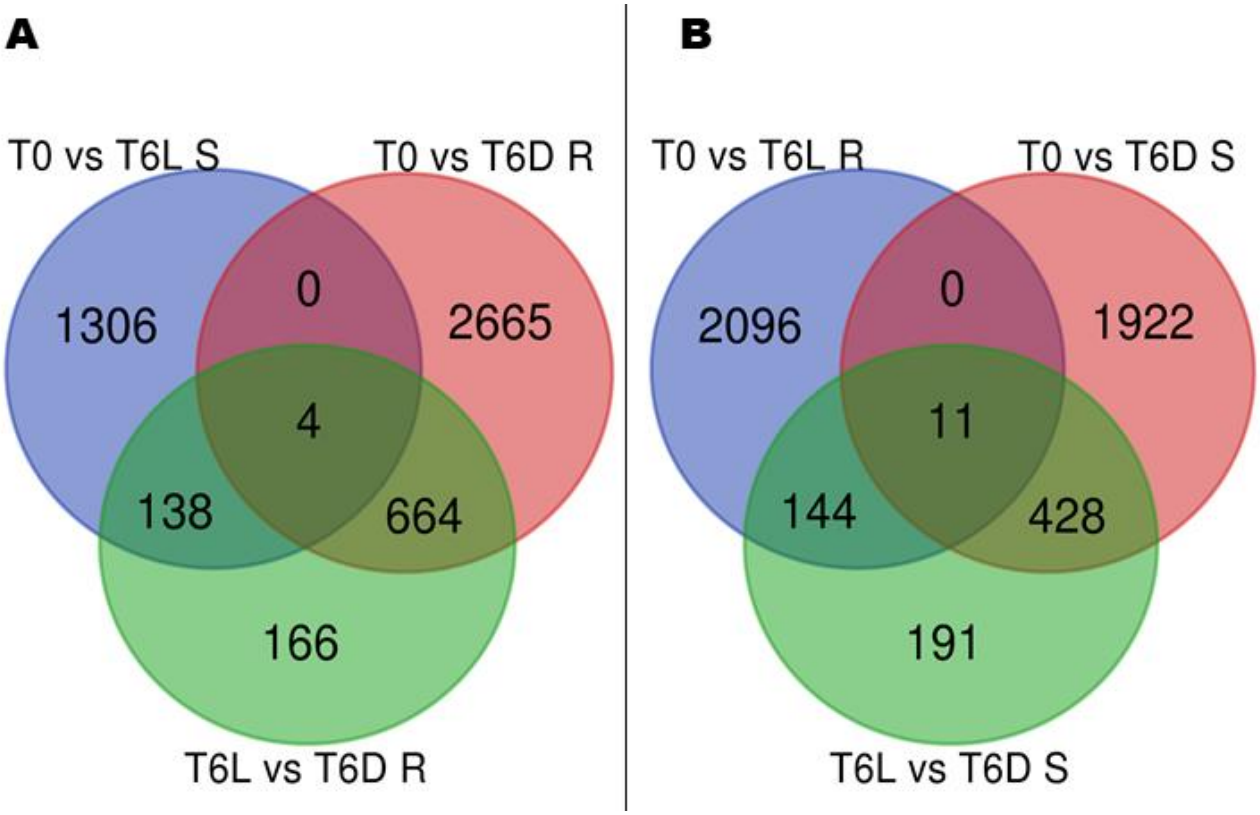

Figure 30 : **Diagramme de Venn représentant les gènes surexprimés ou réprimés au temps t6 à l'obscurité par rapport à la lumière.** S signifie surexprimés par rapport à la condition de référence et R signifie réprimé par rapport à la condition de référence, condition de référence vs condition "traitement").

De plus, 15 (11+4) gènes présentent un profil d'expression particulièrement intéressant dans le sens où ils présentent une réponse inverse en condition lumière et en condition obscurité (Figure 28) et sont également différentiellement exprimés dans la comparaison t6L vs t6D (Figure 29). Parmi ces 15 gènes, quatre gènes présentent une surexpression à la lumière alors qu'ils sont réprimés à l'obscurité. Inversement, 11 gènes sont réprimés à la lumière alors que leur niveau d'expression est accru à l'obscurité.

Afin de savoir si ces gènes sont sous-représentés par rapport à ce qui serait dû au hasard, nous avons réalisé une étude d'appauvrissement de ces gènes à nouveau par un test de distribution hypergéométrique (Tableau III). Nous pouvons, cette fois-ci, observer un appauvrissement ($p \leq 0.05$) de la fraction commune entre les gènes réprimés dans une condition et surexprimés dans l'autre et inversement, et que ce nombre de gènes est moindre à ce qui pourrait être dû au hasard. Il semble donc bien que l'expression de ces gènes soit fortement régulée par les conditions de lumière.

Également, nous avons pu observer Figure 27 qu'il y a 1746 gènes différentiellement exprimés à l'obscurité par rapport à la condition lumière, 6 heures après décapitation (t6L vs t6D). Parmi ces gènes, 972 gènes sont réprimés alors que 774 gènes surexprimés. Nous nous sommes ensuite posé la question de la raison de la différence d'expression observée entre les échantillons t6L et t6D, relativement au temps t0. Par exemple, une surexpression à t6L par rapport à t6D est-elle associée à une surexpression à t6L par rapport à t0 ou bien à une répression à t6D par rapport à t0? Afin d'approfondir cette question, nous avons réalisé deux diagrammes de Venn afin d'expliquer le profil des gènes surexprimés ou réprimés dans la comparaison t6L vs t6D (Figure 30).

Nous pouvons observer Figure 30 A que parmi les 972 gènes réprimés à l'obscurité (t6D), par rapport à t6L, 142 sont aussi surexprimés à t6L par rapport à t0 alors que 668 gènes sont réprimés à t6D par rapport à t0. Le nombre de gènes réprimés dans la comparaison t6L vs t6D serait donc expliqué par un plus fort nombre de gènes réprimés à l'obscurité par rapport au moment après décapitation (t0). De façon logique, nous pouvons retrouver les 4 gènes ayant un profil d'expression inverse entre la condition t6L et t6D par rapport à t0. Ces gènes sont réprimés à t6D par rapport à t6L, ce qui confirme que ces gènes sont sous fort photo-contrôle.

Concernant la Figure 30 B, parmi les 774 gènes surexprimés à t6D par rapport à t6L, 155 gènes sont réprimés à t6L par rapport à t0 alors que 439 gènes sont surexprimés à t6D par rapport à t0. Encore une fois, les gènes surexprimés dans la comparaison t6L vs t6D serait donc surtout expliqué par un plus fort nombre de gènes surexprimés à t6D par rapport au moment après décapitation (t0). De même, nous retrouvons également les 11 gènes ayant un profil d'expression inverse entre les deux conditions d'éclairement par rapport à t0. Ces gènes sont surexprimés à t6D, confirmant également leur expression sous fort photo-contrôle.

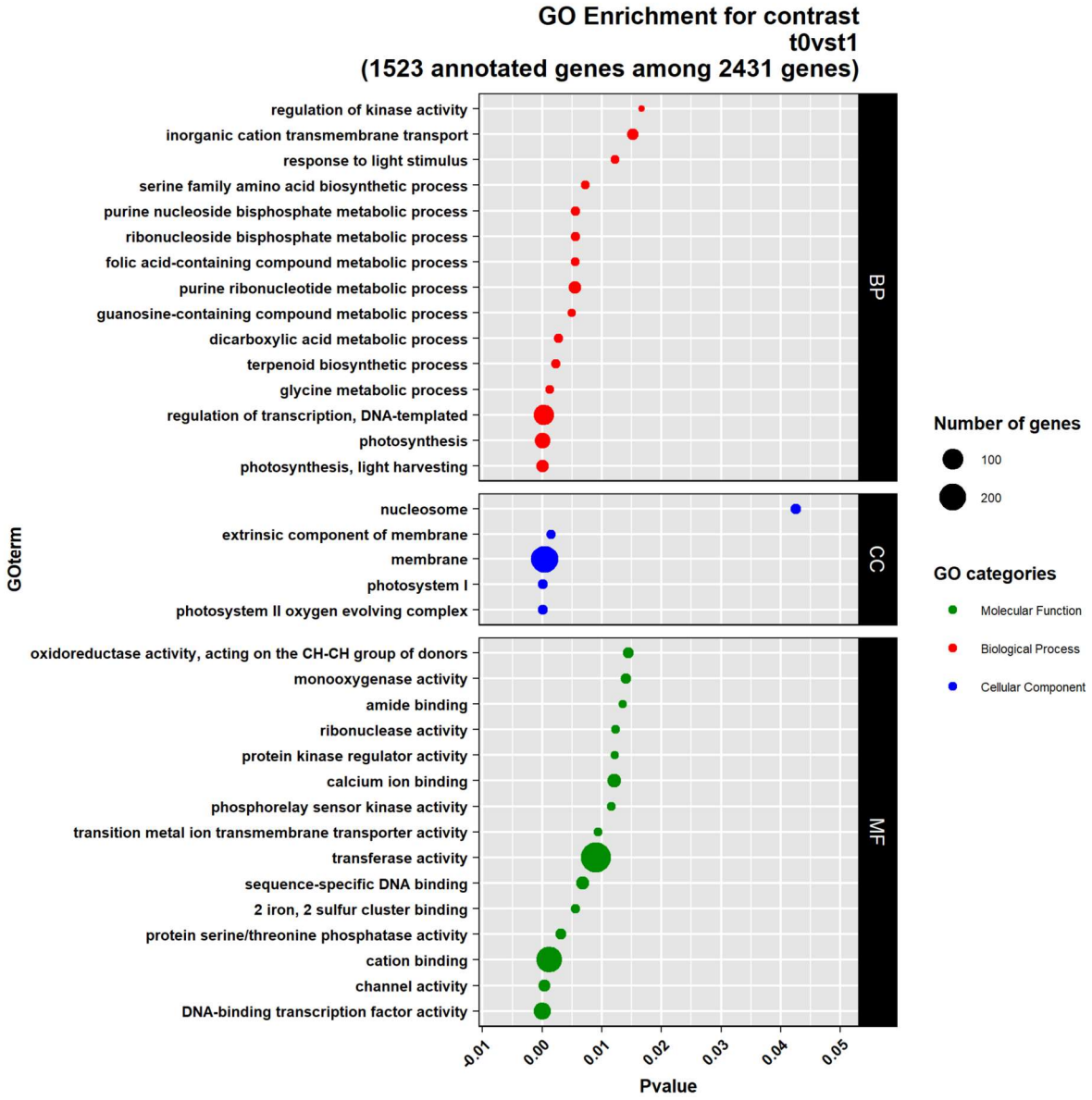

Figure 31 : **Analyse des termes GO des 2431 gènes ayant un changement d'expression indépendant de la condition d'éclairement 6 heures après décapitation.** T1 signifie t6, p≤0.05.

En conclusion, nous avons pu identifier différents groupes de gènes présentant un profil d'expression intéressant, relevant soit d'un potentiel effet décapitation/cycle circadien soit d'un effet de la lumière ou de l'obscurité sur leur expression. Nous allons à présent rechercher les fonctions moléculaires de ces groupes de gènes définis par leur profil d'expression.

2.2. Fonctions des gènes impliqués dans la réponse indépendante aux conditions d'éclairement

Nous avons identifié 2431 gènes qui présentent des modifications d'expression dans le même sens à 6h quelle que soit la condition lumineuse (soit réprimés pour 771 gènes, soit surexprimés pour 1660 gènes, Figure 29). Nous avons émis l'hypothèse que ces régulations traduiraient un effet de la décapitation ou du cycle circadien. La décapitation de l'apex de la tige permet de lever la dominance apicale et d'initier le débourrement des bourgeons axillaires, qui se manifeste notamment par un rapide gonflement quelques heures après la décapitation quelles que soient les conditions d'éclairement (Girault et al., 2008). Nous posons l'hypothèse que la décapitation permet l'activation (ou la répression) de certains mécanismes permettant d'initier (ou de bloquer, respectivement) le débourrement mais que l'absence de lumière chez le rosier entraîne un second verrouillage permettant de maintenir l'inhibition du débourrement. Ces 2431 gènes pourraient donc nous renseigner sur les mécanismes d'activation (ou de répression) du débourrement qui pourraient être induits (ou levés, respectivement) par la décapitation. L'expression d'une autre partie de ces gènes pourraient évoluer en réponse au cycle circadien

Pour connaître un peu plus les fonctions de ces 2341 gènes, nous avons utilisé les bases de données GO et KEGG (Kyoto Encyclopedia Gene and Genomes) et leurs annotations (Figure 20)

2.2.1. Analyse des processus biologiques et fonctions moléculaires par Gene Ontology

L'annotation par Gene Ontology (GO) est classée en trois groupes : BP pour processus biologique (Biological Process), CC pour composant cellulaire (Cellular Component) et MF pour Fonction Moléculaire (Molecular Function).

Parmi les 2341 gènes, la catégorie BP est particulièrement enrichie dans des termes liés au cycle cellulaire et à la régulation transcriptionnelle des gènes ('regulation of transcription, DNA-templated') et par des termes liés à la photosynthèse et réponse à la lumière ('response to light stimulus', 'photosynthesis', 'photosynthesis, light harvesting') (sachant que les gènes étudiés ici sont différentiellement surexprimé ou réprimé à la lumière ET à l'obscurité) (Figure 31).

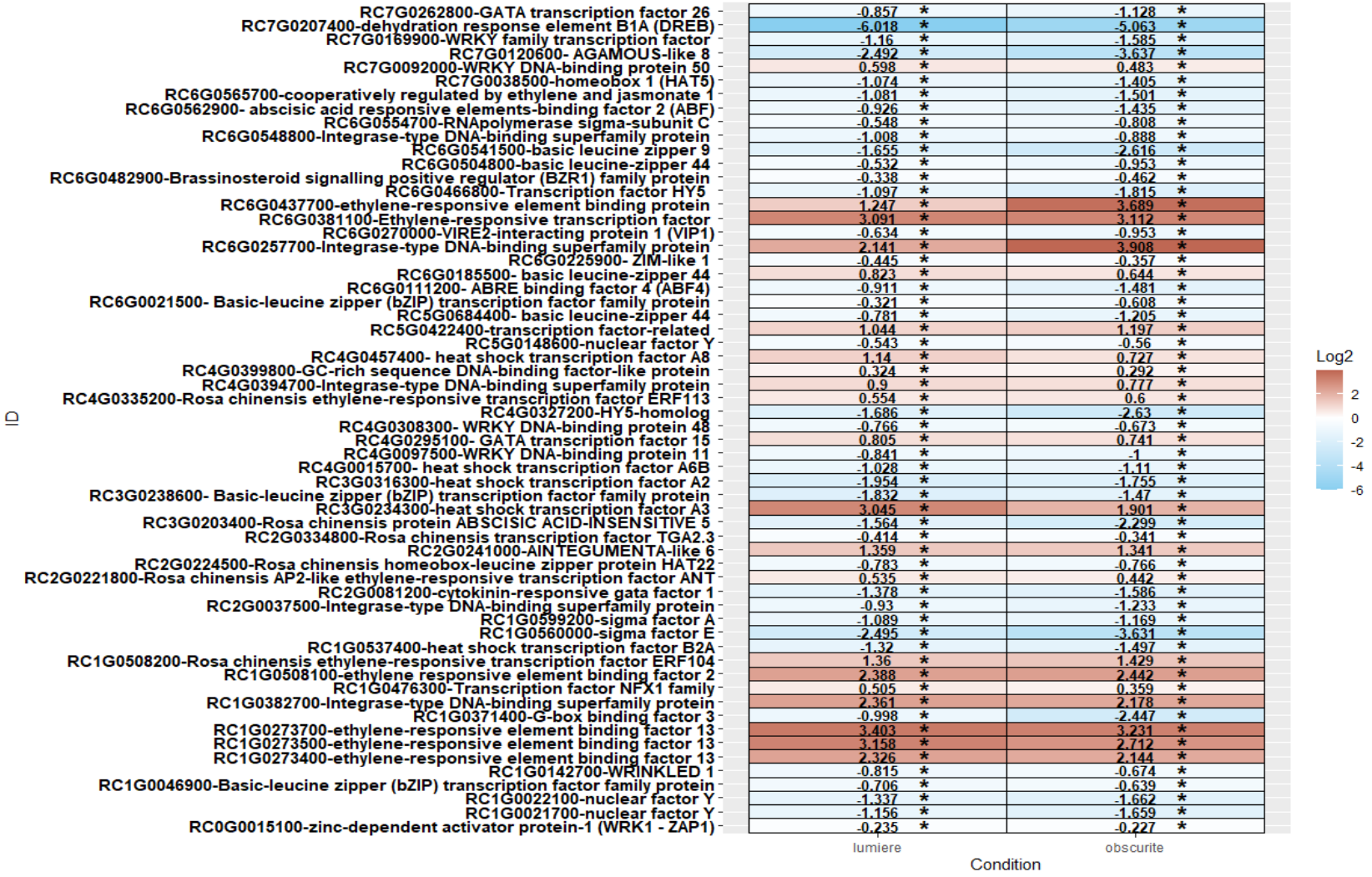

Figure 32 : **Variation de l'expression des gènes codants des facteurs de transcription présentant un différentiel d'expression comparé à t0 indépendamment de la condition lumière ou obscurité à un temps précoce du débourrement suite à la décapitation.** Comparaison de l'expression en Log2 Fold Change des gènes dans le bourgeon de rosier, 6 heures après décapitation à la lumière et à l'obscurité par rapport à t0 (Bleu : gène sous-exprimé, Rouge : gène surexprimé). Les astérisques représentent les différences significatives (p.adj≤0.05).

Cela n'est pas si étonnant, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une partie de ces gènes font partie de la réponse au cycle circadien. En effet, il a été montré que les gènes associés à la réponse à la lumière (signal lumineux) comme les phytochromes ou cryptochromes peuvent être également associés au rythme circadien (Pruneda-Paz et Kay, 2010). De même, il a été montré que le cycle circadien induit la photosynthèse chez *Arabidopsis* (Dodd et al., 2005).

De plus, concernant les fonctions moléculaire (MF), nous pouvons remarquer qu'il y a 60 gènes codants des facteurs de transcription qui présentent une même réponse indépendamment de la lumière ou de l'obscurité (Figure 32). Il aurait donc une régulation transcriptionnelle potentiellement déclenchée par la décapitation au travers de l'activité de facteurs de transcription.

Nous n'allons pas entrer dans la description détaillée de l'ensemble de ces 60 gènes, mais souligner ceux qui pourraient être en relation avec la décapitation.

Parmi ces 60 gènes, nous pouvons tout d'abord noter la présence de 9 gènes liés à la réponse à l'éthylène, tous surexprimés à t6D et t6L. Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'éthylène étant une hormone liée à la réponse au stress et aux blessures (Ryan, 2000), il pourrait y avoir une forte réponse de l'éthylène suite à la blessure entraînée par la décapitation. De plus, nous pouvons noter trois gènes codants des facteurs de transcription liés à la voie de signalisation de l'ABA, *ABI5* (RC3G0203400) *ABF2* (RC6G0562900) et *ABF4* (RC6G0111200) réprimés à t6D et t6L. Selon la littérature, ABI5 est impliqué dans la signalisation et la réponse à l'ABA chez les graines d'*Arabidopsis* (Finkelstein et Lynch, 2000). De même, les ABF (ABA BINDING FACTOR) sont impliqués dans la signalisation de l'ABA en réponse à divers stress abiotiques (sécheresse, froid etc…) (Choi et al., 2000). L'ABA étant une hormone inhibitrice du débourrement chez le rosier (Corot et al., 2017), ces facteurs de transcription pourraient être réprimés suite à la décapitation afin de permettre le débourrement.

Parmi les facteurs de transcription intéressants, nous pouvons aussi observer que le gène *HY5* est réprimé à la lumière (2 fois moins exprimé par rapport au moment juste après décapitation (t0)) et à l'obscurité (3.5 fois moins exprimé) (Figure 32). Ce facteur de transcription bZIP est impliqué dans la transduction du signal lumineux et promeut la photomorphogenèse en agissant de manière directe et indirecte par le contrôle de divers facteurs (Ang et al., 1998 ; Abbas et al., 2014 ; Bhagat et al., 2021). De même, il a été montré que ABI5 et HY5 interagissent ensemble dans l'interaction entre la lumière et l'ABA (Gangappa et Botto, 2016). En effet, HY5 est capable de se fixer au promoteur de *ABI5* et d'en induire son expression (Chen et Xiong, 2008). Également, les protéines HY5 et ABI5 sont capables de lier ensemble pour former un dimère et réguler la signalisation de la lumière et de l'ABA. Selon Gangappa et Botto (2016), HY5 serait capable d'interagir avec un grand nombre de processus (Figure 33).

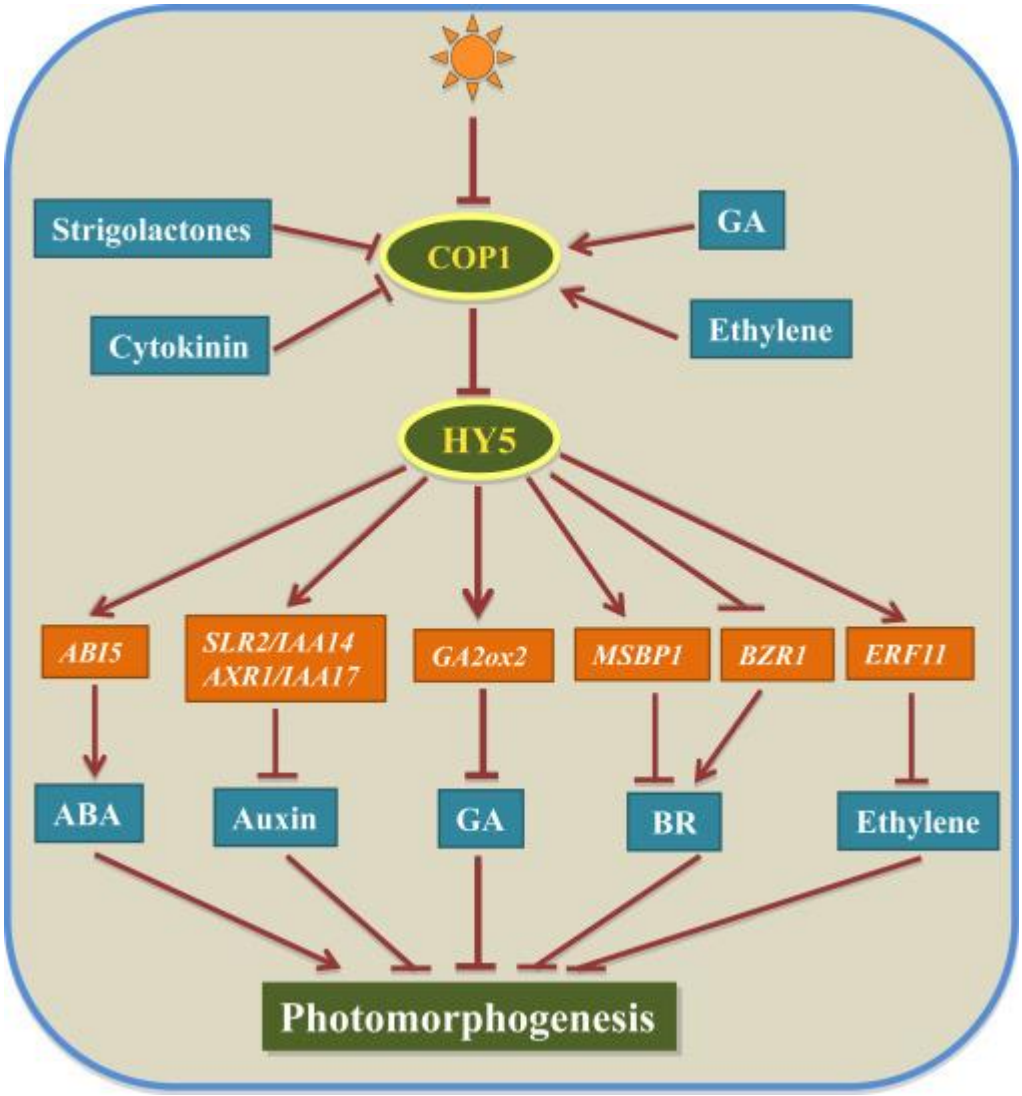

Figure 33 : **Régulation de la photomorphogenèse par HY5 au travers de diverses voies hormonales.** Selon Gangappa et Botto, 2016.

En effet, HY5 serait capable d'inhiber BZR1, un FT impliqué dans la signalisation des Brassinostéroïdes, de réprimer le métabolisme des GA par l'induction de *GA2ox2*, réprimant le métabolisme des GA et également de réprimer la signalisation de l'auxine par l'induction des inhibiteurs de la réponse à l'auxine *IAA7* et *IAA14* (Cluis et al., 2004). Ce facteur de transcription pourrait également avoir un rôle dans la régulation des sucres par l'induction de *TPS1* (Tréhalose 6-phosphate synthase) et de deux transporteurs de saccharose SWEET, *SWEET 11* et *12* (Chen et al., 2016b). Enfin, il y aurait une boucle de régulation entre *HY5* et *COP1* (*CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1*), qui est un répresseur de la photomorphogenèse (Osterlund et al., 1999 ; Huang et al., 2012). COP1 agit comme un répresseur de HY5 en entraînant sa dégradation par le protéasome (Ang et al., 1998) et pourrait donc avoir un rôle central dans le contrôle du débourrement par la régulation post-transcriptionnelle de HY5, qui lui pourrait interagir avec divers acteurs dans le contrôle du débourrement. En conclusion, HY5 semblerait être un facteur de transcription clé, pouvant interagir avec divers acteurs impliqués dans le contrôle du débourrement.

Nous pouvons également remarquer Figure 32 que le gène codant le FT *DREB* (RC7G0207400) est fortement réprimé à la lumière (64 fois moins exprimé par rapport à t0) et à l'obscurité (32 fois moins exprimé). Ce FT est impliqué dans la réponse au stress hydrique. Ce FT est capable de se lier au promoteur du gène *TPP* (Tréhalose 6-phosphate phosphatase) et permet son induction (Lin et al., 2019). Le gène *TPP* permet la conversion de tréhalose 6-phosphate (T6P) en tréhalose. Or il a été montré que la quantité de T6P augmente après décapitation ce qui permet l'initiation du débourrement chez le bourgeon de pois (Fichtner et al., 2017). Le FT *DREB* étant fortement réprimé selon les résultats de notre séquençage, l'induction du gène *TPP* serait réduite ce qui maintiendrait la teneur en T6P dans le bourgeon et favoriserait le débourrement après décapitation.

En conclusion, plusieurs facteurs de transcription ont un rôle potentiel dans le contrôle du débourrement comme HY5 ou DREB. Le FT HY5, en interaction avec COP1, pourrait jouer un rôle central dans le contrôle du débourrement, car il peut interagir avec divers acteurs connus dans le contrôle du débourrement comme l'ABA, l'auxine, les GA et les sucres.

2.2.2. Analyse des voies métaboliques selon la base de donnée KEGG

Nous venons d'identifier les fonctions moléculaires des gènes ayant le même profil d'expression 6 heures après décapitation indépendamment de la condition d'éclairement. Nous allons maintenant nous intéresser plus en détail aux voies métaboliques ou de signalisation dans lesquelles certains de ces gènes sont impliqués grâce à la base KEGG.

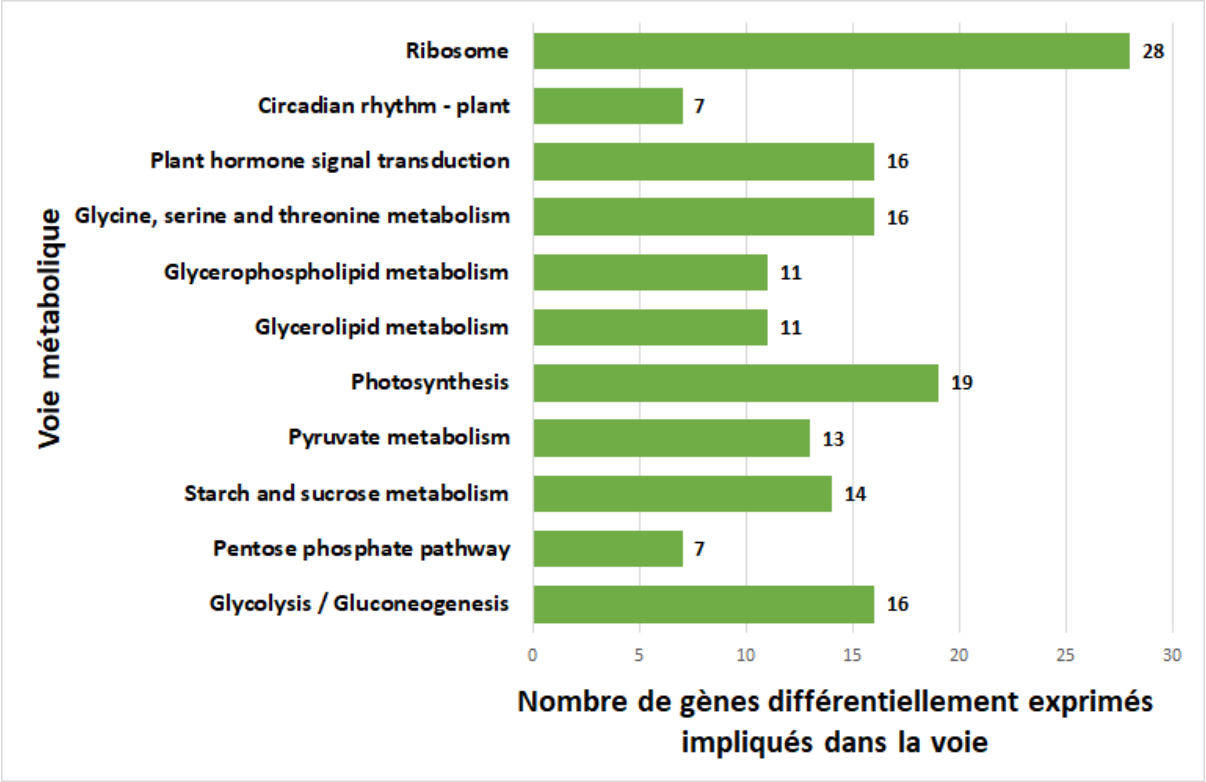

Figure 34 : **Nombre de gènes significativement induits ou réprimés 6 heures après décapitation indépendamment de la condition d'éclairement, impliqués dans les voies métaboliques et hormonales définies selon la base KEGG.**

La Figure 34 représente le nombre de gènes significativement induits ou réprimés 6h après la décapitation et impliqués dans des voies métaboliques ou de signalisation. Parmi ces voies, nous trouvons les voies liées au métabolisme des sucres (Glycolyse, Voie des pentoses phosphate, métabolisme du pyruvate), la transduction de signaux hormonaux, voies dont nous avons décrits l'importance dans la régulation du débourrement (Introduction Partie 3.). Vingt-huit gènes liés aux ribosomes sont aussi identifiés, ce qui témoignerait d'une reprise de l'activité traductionnelle suite à la décapitation (Figure 34). Cela est concordant avec des travaux réalisés chez le pois. En effet, il a été montré que l'expression du gène codant la protéine ribosomale pGB8 est associée au stade de développement du bourgeon axillaire et qu'elle est très fortement induit dès 3 heures après décapitation (Stafstrom et Sussex, 1992). Nous pouvons également noter qu'il y a 7 gènes impliqués dans le rythme circadien induits ou réprimés 6 heures après décapitation. Cela vient appuyer l'hypothèse que nous avons proposée précédemment que parmi les 2341 gènes induits ou réprimés 6 heures après décapitation, à la lumière et à l'obscurité, certains sont impliqués dans le contrôle du cycle circadien des bourgeons.

De plus, nous pouvons noter qu'il y aurait 11 gènes impliqués dans le métabolisme des lipides. Le rôle de cette voie métabolique n'a pas encore été caractérisé dans le contrôle du débourrement suite à la décapitation chez le rosier et il pourrait s'agir d'un métabolisme clé dans ce processus. Cette hypothèse est renforcée par une étude très récente qui met en lumière le potentiel rôle du métabolisme lipidique dans le contrôle du débourrement chez *Brassica napus* (Huang et al., 2021). Cette étude montre l'implication d'un transporteur d'acide gras *BnFAX6* qui agirait comme molécule signal de la dominance apicale. En effet, une surexpression de ce transporteur entraîne une augmentation de la ramification. La décapitation entraînerait aussi une remobilisation du flux de produits carbonés provenant de la photosynthèse vers la biosynthèse d'acides gras. Cette nouvelle voie métabolique est donc intéressante à approfondir dans l'étude du contrôle du débourrement.

2.3. Groupe de gènes ayant un profil d'expression inverse entre la condition lumière et la condition obscurité

En opposition aux gènes présentant la même évolution quelle que soit la condition lumineuse discutés dans la partie précédente, certains gènes ont une évolution inverse à la lumière et à l'obscurité (Figure 29). Cependant nous pouvons noter qu'il n'y a que 15 gènes qui auraient ce profil d'expression ce qui est assez étonnant. Néanmoins, selon nos tests statistiques (Tableau III), ce groupe de gènes est significativement sous-représenté ce qui signifie que leurs différences d'expression sont plus fortes que celles dues au hasard.

Tableau IV : **Variation de l'expression, termes GO et voies métaboliques associées des gènes ayant un profil d'expression inverse dans les bourgeons de plantes cultivées à la lumière ou à l'obscurité, 6 heures après décapitation par rapport au moment après décapitation.** Les variations d'expression sont indiquées en Log2 et en Bleu pour les gènes sous-exprimés, en Rouge pour les gènes surexprimés

N°Accession du génome *Rosa chinensis*	Annotation	GO Processus biologique	GO Fonction moléculaire	VOIE KEGG	Log2 Lumière (t0vst6L)	Log2 Obscurité (t0vst6D)
RC2G0160800	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein	regulation of defense response to fungus (GO:1900150)	metal ion binding (GO:0046872)	-	**1.147**	**-1.292**
RC2G0534500	glycosyl hydrolase 9B8	carbohydrate metabolic process (GO:0005975)	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds (GO:0004553)	-	**0.644**	**-0.875**
RC2G0407100	zinc ion binding	-	-	-	**0.483**	**-0.63**
RC5G0013500	acyl-CoA sterol acyltransferase 1	lipid metabolic process (GO:0006629)	O-acyltransferase activity (GO:0008374)	-	**0.847**	**-1.014**
RC3G0389200	AUX/IAA transcriptional regulator family protein (IAA4)	regulation of transcription, DNA-templated (GO:0006355)	protein binding (GO:0005515)	ko04075 Plant hormone signal transduction	**-1.094**	**1.227**
RC4G0290600	MLP-like protein 423	defense response (GO:0006952) abscisic acid-activated signaling pathway (GO:0009738)	abscisic acid binding (GO:0010427) protein phosphatase inhibitor activity (GO:0004864) signaling receptor activity (GO:0038023)	-	**-1.934**	**1.598**
RC6G0436900	sucrose synthase 3 (SUS3)	sucrose metabolic process (GO:0005985)	sucrose synthase activity (GO:0016157)	ko00500 Starch and sucrose metabolism	**-1.089**	**1.046**
RC5G0595200	RING/U-box superfamily protein	-	-	-	**-0.676**	**0.5**
RC4G0138500	-	-	-	-	**-1.387**	**1.015**
RC1G0350800	BURP domain-containing protein	-	-	-	**-0.958**	**0.763**
RC5G0303500	Aluminium induced protein with YGL and LRDR motifs	-	-	-	**-0.758**	**1.26**
RC5G0201300	plasma-membrane associated cation-binding protein 1	-	-	-	**-0.686**	**0.355**
RC6G0169100	polyol/monosaccharide transporter 5	transmembrane transport (GO:0055085)	transmembrane transporter activity (GO:0022857)	-	**-0.47**	**1.02**
RC1G0560600	regulatory components of ABA receptor 3 (PYL8)	-	-	ko04075 Plant hormone signal transduction	**-0.435**	**0.484**
RC6G0455000	PPPDE putative thiol peptidase family protein	-	peptidase activity (GO:0008233)	-	**-0.472**	**0.564**

Parmi ces 15 gènes, 4 agissent dans la signalisation par les hormones, 2 dans celle des sucres, 1 dans l'expansion cellulaire et 1 gène dans le métabolisme des lipides. Les 7 gènes restants ont une fonction peu voire pas connue (Tableau IV).

Nous pouvons tout d'abord retrouver des gènes impliqués dans la signalisation et la réponse à l'ABA : *PYL8* RC1G0560600, MLP-like protein RC4G0290600 et le gène RC5G0595200. Ces gènes sont réprimés à la lumière (1.5, 4 et 1.6 fois moins exprimés respectivement) et induits à l'obscurité (1.3, 3 et 1.4 fois plus exprimés respectivement). Le profil d'expression de ces gènes est en concordance avec les précédents travaux publiés sur le rôle de l'ABA dans le contrôle du débourrement (Corot et al., 2017). En effet, l'ABA a un effet inhibiteur du débourrement, donc une répression de sa signalisation à la lumière permet de réduire son action inhibitrice et de favoriser le débourrement ; inversement, une induction de la signalisation ABA à l'obscurité contribuerait à maintenir le bourgeon à l'état dormant (Yao et Finlayson, 2015 ; Corot et al., 2017).

Toujours parmi la signalisation hormonale, nous retrouvons également un gène codant un facteur de transcription de la famille des AUX/IAA (IAA4) qui sont des répresseurs de la voie de réponse à l'auxine. Ce gène est réprimé à la lumière (2 fois moins exprimé) et induit à l'obscurité (2 fois plus exprimé) par rapport au moment t0. L'expression des AUX/IAA étant induite par l'auxine, ces résultats corrèlent une diminution de la quantité d'auxine dans le bourgeon. Cette hypothèse est en accord avec un export d'auxine du bourgeon pour permettre son débourrement (Barbier et al., 2015). Ces résultats sont concordants avec l'étude sur le chrysanthème où il a été montré que plusieurs gènes codant des AUX/IAA dont notamment IAA4 sont réprimés après décapitation (Sun et al., 2021).

De plus, deux gènes liés au métabolisme des sucres présentent un profil d'expression opposé lumière versus obscurité à 6h. En effet, il s'agit de gènes codant une sucrose synthase (RC6G0436900) et un transporteur de polyols Polyol Transporter (*PLT*, RC6G0169100) qui sont réprimés à la lumière (2 et 1.5 fois moins exprimés respectivement) et induits à l'obscurité (2 et 1.3 fois plus exprimés respectivement).

Le gène *PLT* code un transporteur de sorbitol ou de mannitol situé dans la membrane plasmique (Gao et al., 2003 ; Klepek et al., 2005 ; Klepek et al., 2010). Notamment, il a été montré dans la littérature que le métabolisme et le transport de saccharose sont réprimés à l'obscurité dans les bourgeons de rosier, ce qui entraîne un basculement vers le métabolisme du sorbitol, ce qui se rapproche d'un mécanisme de survie (Girault et al., 2010 ; Henry et al., 2011). De même, il a été montré que l'activité transcriptionnelle de la *RhNAD-SDH (NAD-DEPENDANT SORBITOL DEHYDROGENASE)* est très fortement induite chez des bourgeons de rosier exposés à l'obscurité (Girault et al., 2010).

Cela est concordant avec nos résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse que le transport de sorbitol via l'induction du gène *PLT* est activé à l'obscurité en réponse à la répression du métabolisme du saccharose.

Deuxièmement, il a été montré que le sucre promeut le débourrement (Girault et al., 2010 ; Barbier et al., 2015 ; Bertheloot et al., 2020). Nos résultats sur l'expression de la sucrose synthase ne semblent pas cohérents avec ces précédents travaux. En effet, il a été montré que le gène *RhSUSY* (*SUCROSE SYNTHASE*) est induit à la lumière au cours du débourrement (Girault et al., 2010 ; Barbier et al., 2015). Cependant il a été montré dans la feuille de maïs que les protéines SUS (Sucrose synthase) s'accumulent dans les feuilles placées à l'obscurité et sont dégradées à la lumière (Qiu et al., 2007). Cependant cette étude concerne l'activité protéique alors que dans le séquençage nous nous intéressons à l'expression des gènes. De plus, les précédents travaux ont porté sur la sucrose synthase 1 et ici nous étudions une sucrose synthase 3. Également, les sucrose synthases ont une activité réversible de synthèse et de dégradation du saccharose. Nous pouvons supposer que la sucrose synthase 3 a une activité différente de la sucrose synthase 1. Egalement, il a été montré que chez la tomate les gènes codants les sucrose synthase ont un profil d'expression spatio-temporel différent (Goren et al., 2011). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que les sucrose synthase 1 et 3 ont des profils d'expression différents chez le rosier.

De plus, un gène (*CEL*) impliqué dans l'expansion cellulaire (RC2G0534500) codant une glycosyl hydrolase également appelée cellulase a été identifié. Ce gène est surexprimé à la lumière (X1.5) et réprimé à l'obscurité (/2) par rapport à t0. Ce gène a été étudié pour son rôle dans l'élongation de la racine primaire chez *Arabidopsis* mais sa fonction n'est pas beaucoup documentée (Xu et al., 2014). Les cellulases participent au relâchement pariétal nécessaire à l'élongation cellulaire. Nos résultats sont donc concordants avec la reprise de l'élongation cellulaire lors du débourrement à la lumière après décapitation.

Egalement, nous pouvons noter qu'un gène codant une acyl-transferase *ACYL-COA STEROL ACYL TRANSFERASE* (RC5G0013500) est surexprimé à la lumière (x1.8) et réprimé à l'obscurité (/2). Chez l'orge, une acyl CoA acyl-transférase codée par le gène *MND1* (*MANY NODED DWARF1*) a aussi été impliquée dans le contrôle de l'architecture et serait exprimé dans les zones d'initiation de méristème axillaire (Walla et al., 2020). Le métabolisme des lipides pourrait avoir un rôle dans le photo-contrôle du débourrement chez le rosier.

D'autres gènes comme *PLASMA-MEMBRANE ASSOCIATED CATION-BINDING PROTEIN 1* (RC5G0201300) et Aluminium induced protein (RC5G0303500) n'ont pas encore été étudié dans le cadre du contrôle du débourrement et ont des fonctions biologiques peu connues notamment pour le gène RC5G0303500. Le gène (RC5G0201300) serait impliqué dans la réponse immunitaire chez *Arabidopsis* en réponse aux flagellines (Giovannoni et al., 2021).

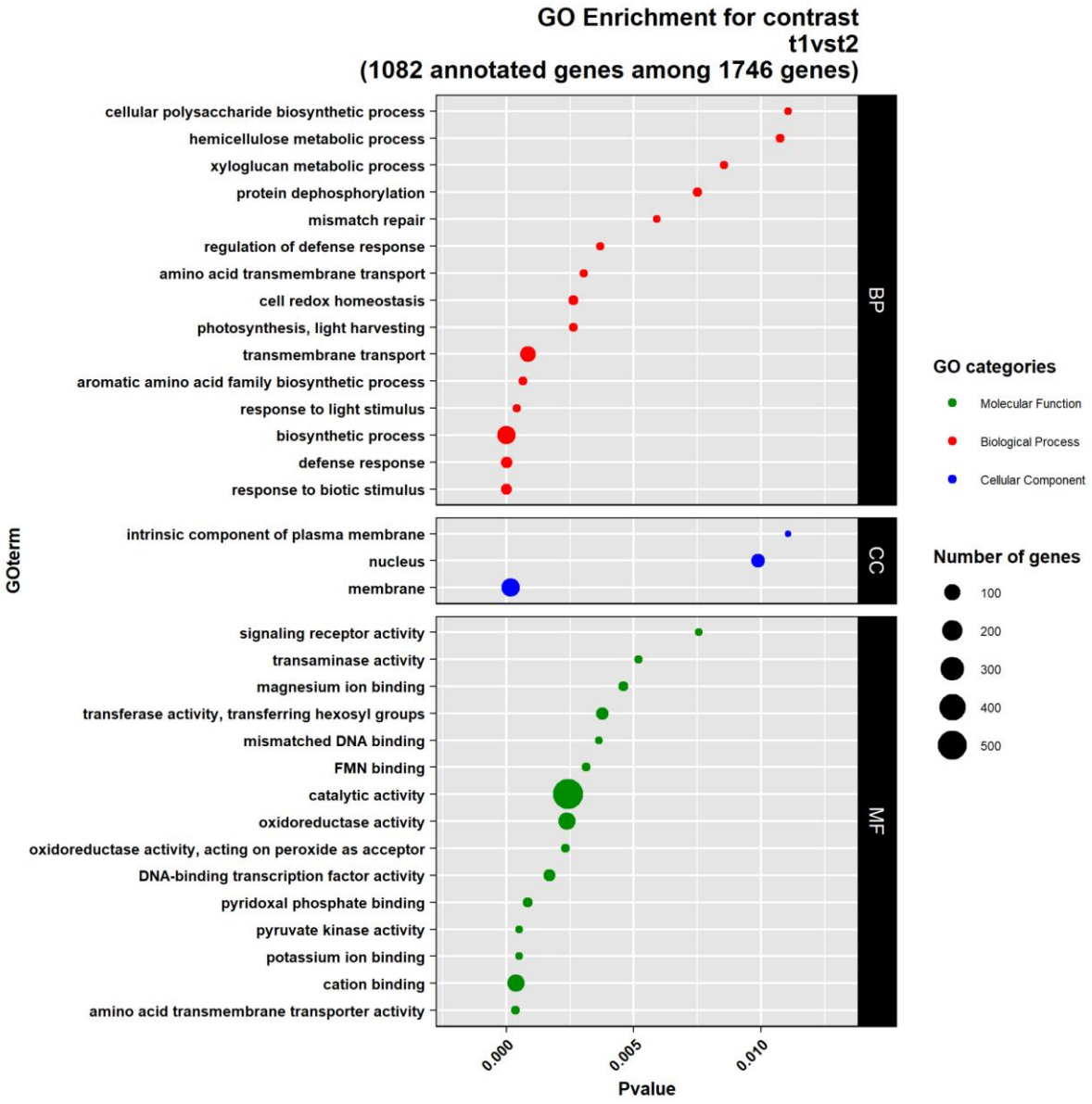

Figure 35 : **Analyse détaillée des 1746 gènes différentiellement exprimés dans les bourgeons 3 de plantes cultivées 6 heures à l'obscurité après décapitation versus 6 heures après décapitation à la lumière.** (t1 signifie t6L et t2 signifie t6D, p≤0.05).

Ces gènes ayant un profil d'expression inverse entre la lumière et l'obscurité, seraient très intéressant à étudier dans la photo-régulation du débourrement. Vu leur profil d'expression (induit à l'obscurité), ces gènes pourraient être inhibiteurs du débourrement.

Et enfin les gènes RC1G0350800 (BURP domain-containing protein), RC2G016800 (protein kinase family protein), RC2G0407100 (zinc ion binding), RC4G0138500 et RC6G0455000 (PPPDE putative thiol peptidase family protein) n'ont pas de fonction connue dans la littérature mais restent des candidats intéressant à étudier pour leur profil d'expression. Le domaine protéique BURP est retrouvé chez des protéines sécrétoires et dont certaines sont impliquées dans la modification de la paroi cellulaire (Park et al., 2015).

Au final, parmi ces 15 gènes qui ont un profil d'expression inverse (t0 vs t6L et t0 vs t6D), nous retrouvons des gènes impliqués dans des métabolismes connus dans le contrôle du débourrement. En effet, nous avons pu étudier 4 gènes impliqués dans le métabolisme de deux hormones inhibitrices du débourrement : l'auxine et l'ABA. Nos données indiquent que ces gènes sont réprimés à la lumière et induits à l'obscurité dès 6h après la décapitation ce qui révèle une réponse transcriptionnelle très précoce.

De plus, nous avons pu identifier une nouvelle voie candidate encore peu étudiée dans le contrôle du débourrement : le métabolisme des lipides. En effet, nous avons pu noter le gène acyl transférase comme étant induit à la lumière, 6 heures après décapitation et réprimé à l'obscurité, ce qui peut nous laisser penser que ce gène a un effet inducteur du débourrement chez le rosier. Pour finir, sur les 15 gènes identifiés ici, 8 gènes ont des fonctions peu ou pas décrites dans la littérature mais restent des candidats intéressants dans le contrôle transcriptionnel précoce du débourrement, étant fortement photo-régulés.

2.4. Fonction des gènes sous photo-contrôle au point 6 heures après décapitation.

La comparaison du transcriptome à t6L et t6D (Figure 26) permet de comparer des échantillons au même moment et ayant subi le même traitement, excepté la condition lumineuse. Elle permet donc de passer outre l'effet de la décapitation et du cycle circadien et d'étudier uniquement l'effet de la condition de lumière sur l'expression des gènes et donc de les relier aux phases précoces du débourrement.

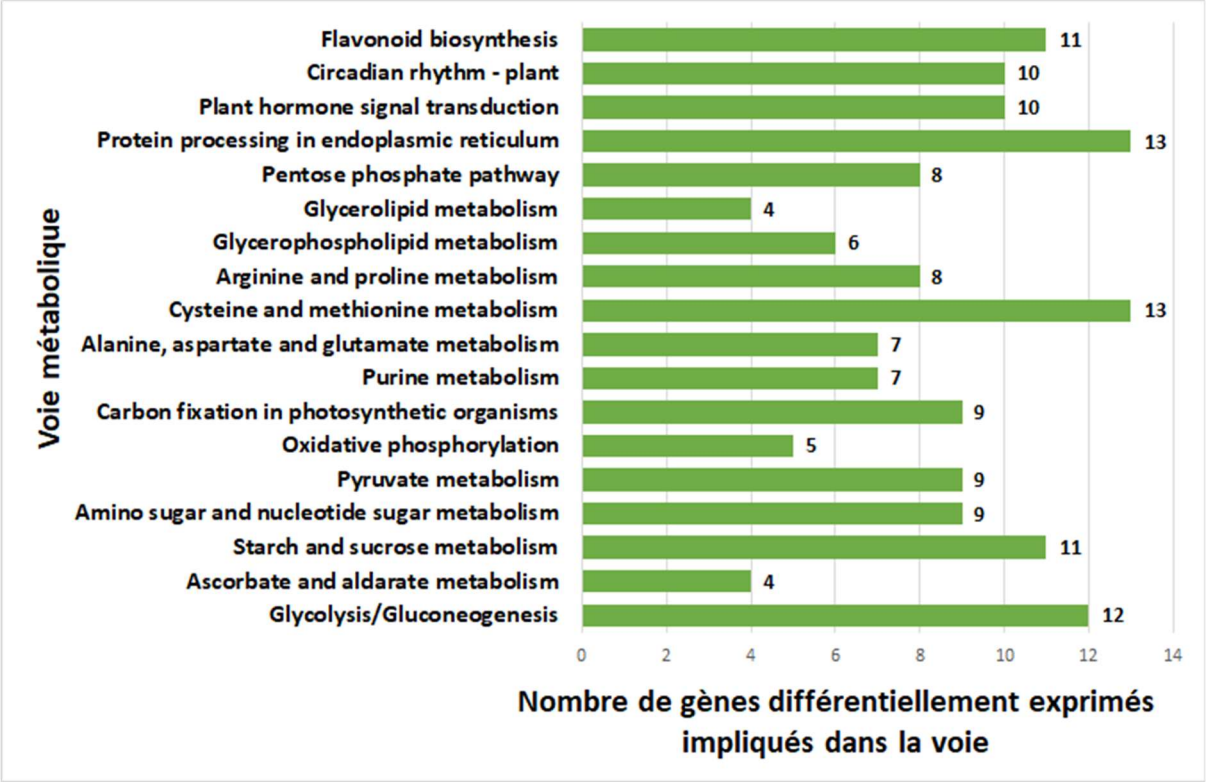

Figure 36 : **Nombre de gènes différentiellement exprimés à l'obscurité (t6D) comparé à la condition lumière (t6L) impliqués dans les voies métaboliques définies selon KEGG.**

2.4.1. Analyse des processus biologiques et fonctions moléculaires par Gene Ontology

Parmi les gènes différentiellement surexprimés (774) ou réprimés (972) à t6D en comparaison avec t6L, la catégorie (BP) particulièrement enrichie est la catégorie “biosynthetic process” (Figure 35). En effet, nous pouvons observer qu’il y a environ 200 gènes impliqués dans des processus de biosynthèse qui sont différentiellement exprimés. Il y aurait donc une forte régulation des processus métaboliques par la condition lumineuse. Nous notons également 13 gènes impliqués dans la photosynthèse et la réponse au stimulus lumière ce qui est logique vu que les plantes sont placées dans des conditions lumineuses différentes. De plus, nous retrouvons également un certain nombre de gènes impliqués dans le transport transmembranaire (83 gènes) et notamment celui des acides aminés (6 gènes). En particulier, concernant les acides aminés, il y a 7 gènes différentiellement exprimés qui sont statistiquement enrichis concernant la catégorie du processus de biosynthèse d’acide aminés aromatique (Figure 35). Nous pouvons une nouvelle fois émettre l’hypothèse que le métabolisme de certains acides aminés pourrait avoir un rôle dans le contrôle du débourrement chez le rosier.

Après avoir analysé les fonctions biologiques des gènes dont l’expression est régulée par la condition lumière, nous nous intéressons plus en détail aux voies métaboliques dans lesquelles ces gènes sont impliqués.

2.4.2. Gènes différentiellement exprimés impliqués dans des voies métaboliques selon la base de données KEGG

La figure 36 représente le nombre de gènes différentiellement exprimés à t6D par rapport à t6L. Nous pouvons observer tout d’abord que nous retrouvons plusieurs voies déjà caractérisées dans le contrôle du débourrement suite à la levée de la dominance apicale par décapitation de l’apex comme la signalisation hormonale et le métabolisme des sucres mais également de nouvelles voies comme la biosynthèse des flavonoïdes et le métabolisme de plusieurs acides aminés.

Nous nous sommes intéressé de façon plus poussée à deux voies, une bien caractérisée et l’autre non, dans le contrôle du débourrement : la voie hormonale (dont 10 gènes différentiellement exprimés sont impliqués dans le signal hormonal, Figure 37) et la voie des flavonoïdes (dont 11 gènes sont impliqués dans cette voie, Figure 39). Cette dernière n’a pas encore été bien caractérisée dans le contrôle du débourrement chez le rosier. Néanmoins, les flavonoïdes ont été associés notamment à la dormance du bourgeon chez quelques plantes comme la vigne ou le riz (Min et al., 2017 ; Zha et al., 2019).

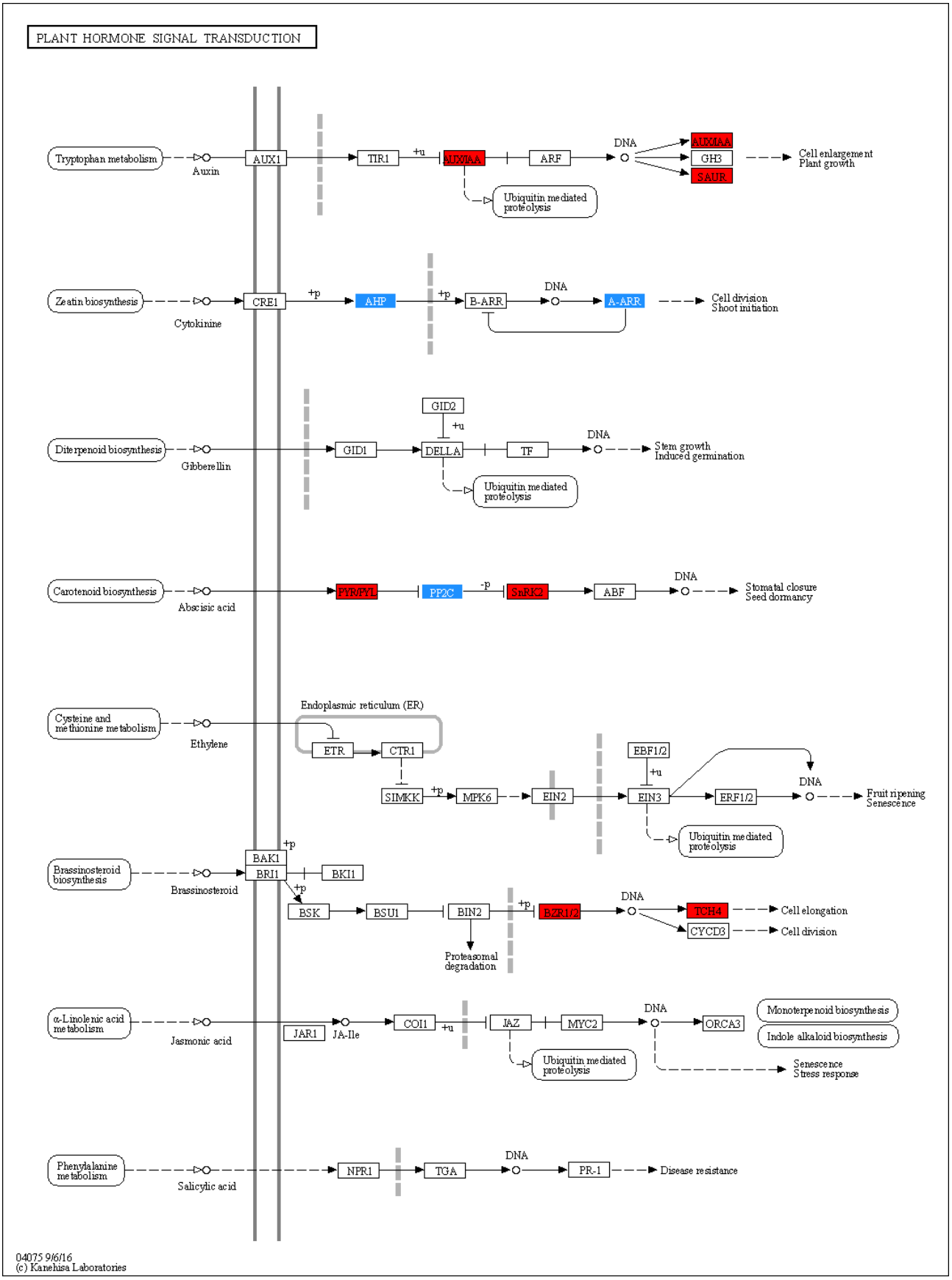

Figure 37 : **Gènes impliqués dans la signalisation hormonale différentiellement exprimés à l'obscurité (t6D) par rapport à la condition lumière (t6L).** (Bleu : gènes sous-exprimés à l'obscurité, rouge : gènes surexprimés à l'obscurité).

2.4.2.1. Voie des hormones

Nous nous intéressons dans un premier temps à la signalisation des hormones sous photo-contrôle. Nous pouvons voir Figure 37 que nous retrouvons 3 hormones bien décrites concernant le contrôle du débourrement : l'auxine, les cytokinines et l'ABA.

Concernant la voie de l'auxine et de l'ABA, ces hormones ont été montrées comme étant des hormones inhibitrices du débourrement (Barbier et al., 2015 ; Corot et al., 2017) et que des gènes impliqués dans leur signalisation sont induits à l'obscurité (t6D) par rapport à la condition lumière (t6L). Nous pouvons observer que les gènes codants des facteurs de transcription AUX/IAA (RC0G0048900 *IAA14*, RC2G0049400 *IAA1*, RC2G0452500 *IAA19*, RC3G0389200 *IAA4*) ainsi que les gènes *SAUR* (RC5G0502800 *SAUR23*, RC6G0043400 *SAUR6*, RC6G0209200 *SAUR51*, RC7G0303500 *SAUR7*) sont surexprimés (entre 1.84 à 5 fois plus exprimés) à l'obscurité (t6D) par rapport à la condition lumière (t6L) (Figure 38). Concernant la voie de signalisation de l'ABA, nous pouvons noter que celle-ci est induite à l'obscurité. En effet, plus précisément, nous pouvons observer que les gènes PYL/PYR sont surexprimés, le gène RC1G0484500 (*PYL5*) étant le gène le plus surexprimé (21.7 fois plus exprimé à l'obscurité (t6D) par rapport à la condition lumière (t6L)). La surexpression des gènes PYR/PYL entraînerait une augmentation de la quantité de protéines PYR/PYL, qui se fixent sur les promoteurs des gènes *PP2C* en présence d'ABA, entraînant la répression des gènes *PP2C* (RC1G0569200 *PP2C-A*, RC2G0066800 *PP2C-B*, RC5G0571100 *PP2C-C*). Ces gènes sont significativement réprimés à l'obscurité (entre 2.5 à 6.25 fois moins exprimés). Cette inhibition permet la levée de l'effet répresseur des protéines PP2C sur le gène *SnRK2-A* (RC7G0543700) qui est surexprimé (1.3 fois plus exprimé à l'obscurité par rapport à la condition lumière).

Enfin, les CKs sont des hormones promotrices du débourrement (Roman et al., 2016). Nous pouvons observer que leur signalisation est réprimée à l'obscurité. En effet, les gènes *AHP* et *ARR-A1* sont réprimés à l'obscurité (1.62 et 2 fois moins exprimés).

De plus, nous pouvons observer une nouvelle voie encore peu décrite dans le contrôle du débourrement : la voie de signalisation des BR. Nous pouvons noter que cette voie est induite à l'obscurité. En effet, deux gènes *TOUCH4 (TCH4A* et *B)* et le gène *BZR1* sont surexprimés (2.18, 4.7 et 1.88 fois plus exprimés respectivement). Le gène *BZR1* est impliqué dans la signalisation des BR et la régulation de l'élongation cellulaire (Oh et al., 2014). La protéine TCH4 est une protéine xyloglucane endotransglycosylase et son gène codant est induit par l'auxine et les BR (Xu et al., 1995). A l'obscurité, le bourgeon de rosier n'exporte pas son auxine et donc ne débourre pas, cela pourrait expliquer l'induction de l'expression de *TCH4* par l'auxine. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que les BR seraient inhibiteurs du débourrement.

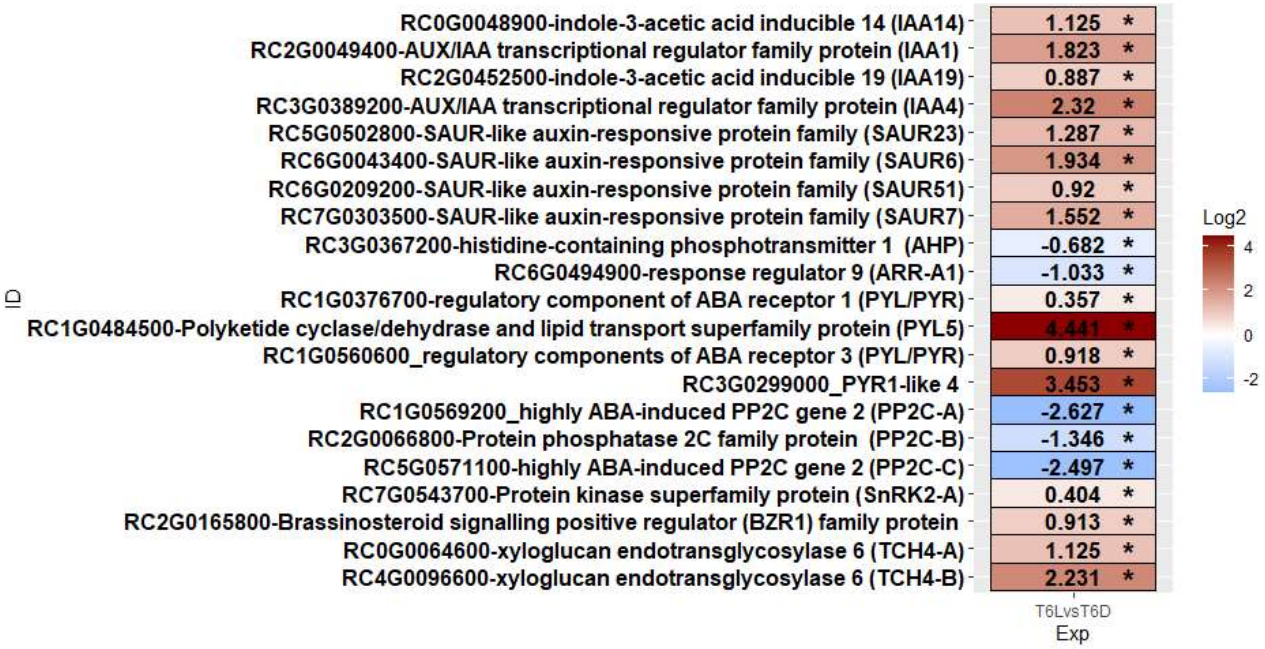

Figure 38 : **Variation de l'expression des gènes DE à l'obscurité par rapport à la condition lumière, associés à la transduction du signal de différentes hormones.** Comparaison de l'expression en Log2 Fold Change des gènes dans le bourgeon de rosier, 6 heures après décapitation à l'obscurité (Bleu : gènes sous-exprimés, rouge : gènes surexprimés). Les astérisques représentent les différences significatives (p.adj≤0.05).

A l'inverse, il a été montré chez la tomate que les BR seraient promoteurs du débourrement par l'activation du facteur de transcription BZR1 par les sucres entraîne la suppression de l'expression de BRC1 et donc promeut le débourrement (Xia et al., 2021). Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'implication des BR dans le contrôle du débourrement est une espèce dépendante. De plus, la tomate étant capable de débourrer à l'obscurité, cela renforce notre hypothèse de mécanismes impliquant les BR dans le contrôle du débourrement qui sont espèces-dépendants.

En conclusion, le verrouillage du débourrement à l'obscurité chez le rosier pourrait être dû par l'induction de la signalisation d'hormones inhibitrices du débourrement comme l'auxine, l'ABA et les BR et par la répression de la signalisation des CK.

2.4.2.2. Voie des flavonoïdes

Après avoir détaillé les résultats obtenus sur des voies métaboliques bien décrites dans le contrôle du débourrement : les hormones, nous nous intéressons à une nouvelle voie métabolique qui n'a pas été étudiée dans le cadre du contrôle du débourrement et pour laquelle nous avons identifié un nombre important de gènes différentiellement exprimés en fonction de la fonction lumineuse : la synthèse des flavonoïdes (Figure 39). Ainsi, nous pouvons voir Figure 39 que 11 gènes différentiellement exprimés à l'obscurité seraient impliqués dans la biosynthèse des flavonoïdes. Plus précisément, un nombre important de gènes impliqués dans cette voie sont entre 1.5 à 3.7 fois moins exprimés à l'obscurité (Figure 40). Le gène le plus sous exprimé est le gène *CHALCONE SYNTHASE (CHS)* (exprimé environ 3.7 fois moins). Cette voie métabolique semble donc fortement réprimée à l'obscurité par rapport à la condition lumière et il serait intéressant d'étudier son potentiel rôle dans le contrôle du débourrement.

Sur cette base, nous posons l'hypothèse que les flavonoïdes joueraient un rôle dans le contrôle du débourrement. Cette hypothèse est de surcroît appuyée par les données de la littérature. En particulier, les flavonoïdes ont été associées à la dormance du bourgeon chez d'autres espèces comme la vigne (Min et al., 2017) ou le riz (Zha et al., 2019) et à la répression de l'export d'auxine. La décapitation pourrait entraîner une diminution de la quantité de flavonoïdes dans le bourgeon et permettrait donc d'augmenter l'export d'auxine via le PATS (Polar Auxin Transport Stream) (Sun et al., 2021). Les travaux réalisés chez le chrysanthème démontrent une forte répression des gènes liés à la synthèse des flavonoïdes dès 3 heures après décapitation parmi lesquels les gènes *CHS* et *CYP75B1* (Sun et al., 2021). De plus, il a été montré chez le coton qu'une diminution de la quantité de flavonoïdes au cours du débourrement est associée à une induction des gènes liés à la voie des flavonoïdes, qui promeut le transport d'auxine dans les bourgeons axillaires (Shi et al., 2021). Les données de la littérature nous laissent affirmer que les flavonoïdes ont un rôle dans le contrôle du débourrement.

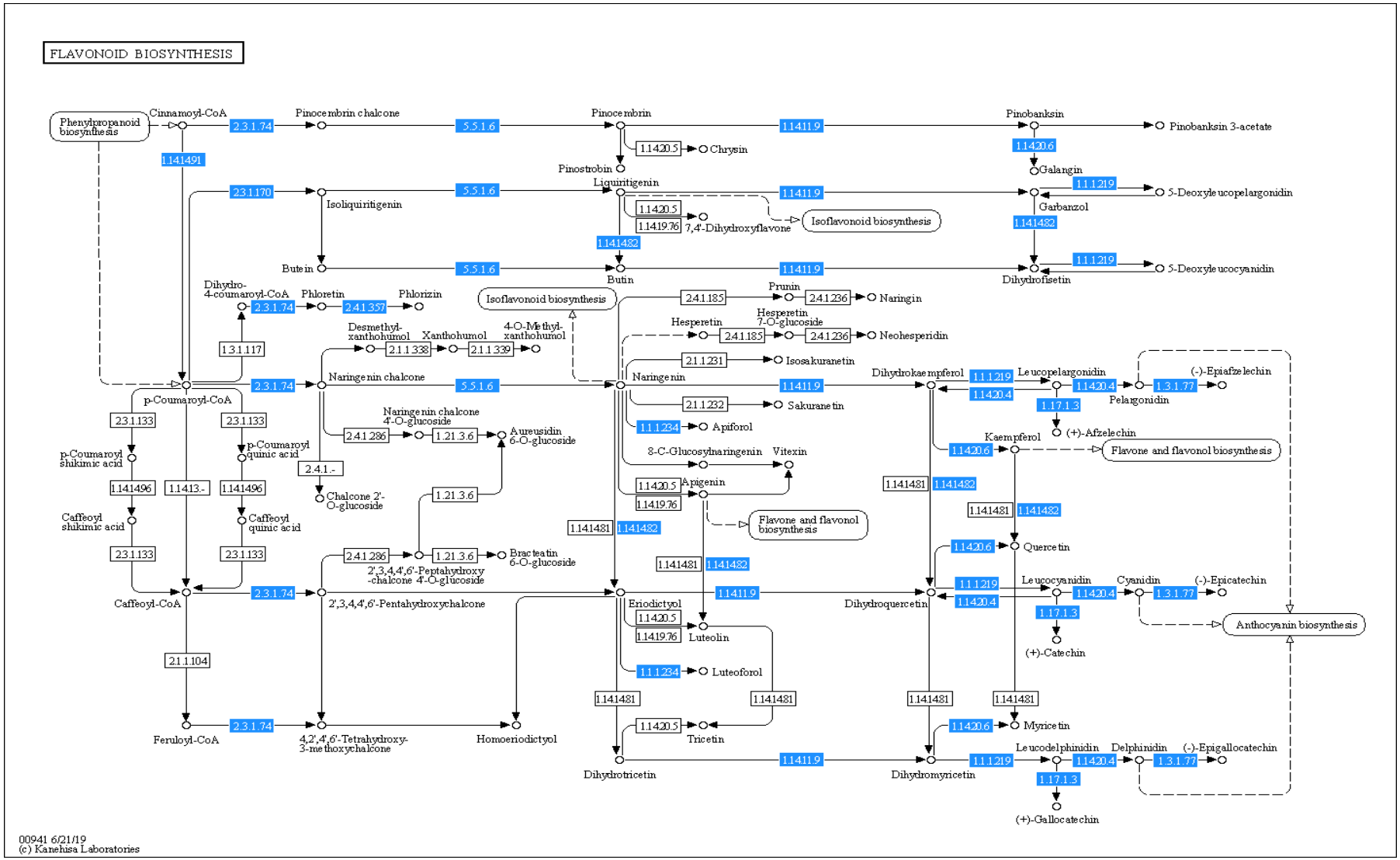

Figure 39 : **Gènes impliqués dans la biosynthèse des flavonoïdes différentiellement exprimés à l'obscurité (t6D) par rapport à la condition lumière (t6L).** (Bleu : sous-exprimés)

Nous pouvons supposer que les gènes associés à la biosynthèse des flavonoïdes sont induits à t6L, et sont donc considérés comme réprimés dans la condition t6D par rapport à la condition t6L.

2.5. Fonction des gènes sous photo-contrôle au cours du débourrement

Nous avons identifié 4501 gènes qui sont surexprimés ou réprimés soit uniquement à la lumière (673+580) ou soit uniquement à l'obscurité (1579+1669) par rapport au moment t0 (Figure 29). Ces gènes sont à la fois sous photo-contrôle et sous contrôle temporel entre 0 et 6 heures après décapitation. Nous avons souhaité connaître davantage la fonction de ces gènes. Pour cela nous avons à nouveau utilisé les bases de données GO et KEGG afin de mieux comprendre les voies induites ou réprimées par les conditions de lumière.

2.5.1. Analyse des processus biologiques et fonctions moléculaires par Gene Ontology associés aux gènes sous photo-contrôle et contrôle temporel

Les gènes étant surexprimés (673 gènes) et réprimés (580) strictement à la lumière sont enrichis en termes GO associés au cycle cellulaire et mécanismes de transcription (DNA process, cell division, mismatch repair), ainsi qu'aux hormones (hormone-mediated signaling pathway) (Figure 41). Ceci est en concordance avec ce qui a été montré précédemment. En effet, il a été montré que le débourrement est caractérisé par une reprise de l'activité cellulaire (Girault et al., 2008). Suite à la décapitation, la dominance apicale est levée permettant ainsi le débourrement du bourgeon axillaire 3 une activation des gènes liés au cycle cellulaire. Nous pouvons tout de même noter que nous retrouvons ces mêmes fonctions pour les gènes différentiellement exprimés indépendamment de la condition d'éclairement, ce qui signifie qu'il existe des processus communs entre le contrôle et le photo-contrôle du débourrement (Partie 2.2.).

Nous pouvons observer Figure 41 qu'il y a environ une centaine de gènes associés au terme GO "Biosynthetic process" et une autre centaine pour le terme nucleobase-containing compound metabolic process. Cela signifie qu'il y a une forte activité de synthèse et activation des processus métaboliques à la lumière.

Les gènes étant induits (1579 gènes) et réprimés (1669) uniquement à l'obscurité sont enrichis en termes GO associés au cycle cellulaire et mécanisme de transcription (RNA splicing, cell wall macromolecule biosynthetic process), également au métabolisme carboné (cellular polysaccharide biosynthetic process, glycolytic process) (Figure 42). De plus, nous pouvons observer Figure 42 qu'il y a environ 770 gènes (sur les 3246 différentiellement exprimés à l'obscurité) associés au terme GO "Metabolic process". Il y aurait donc une forte régulation des processus métaboliques à l'obscurité.

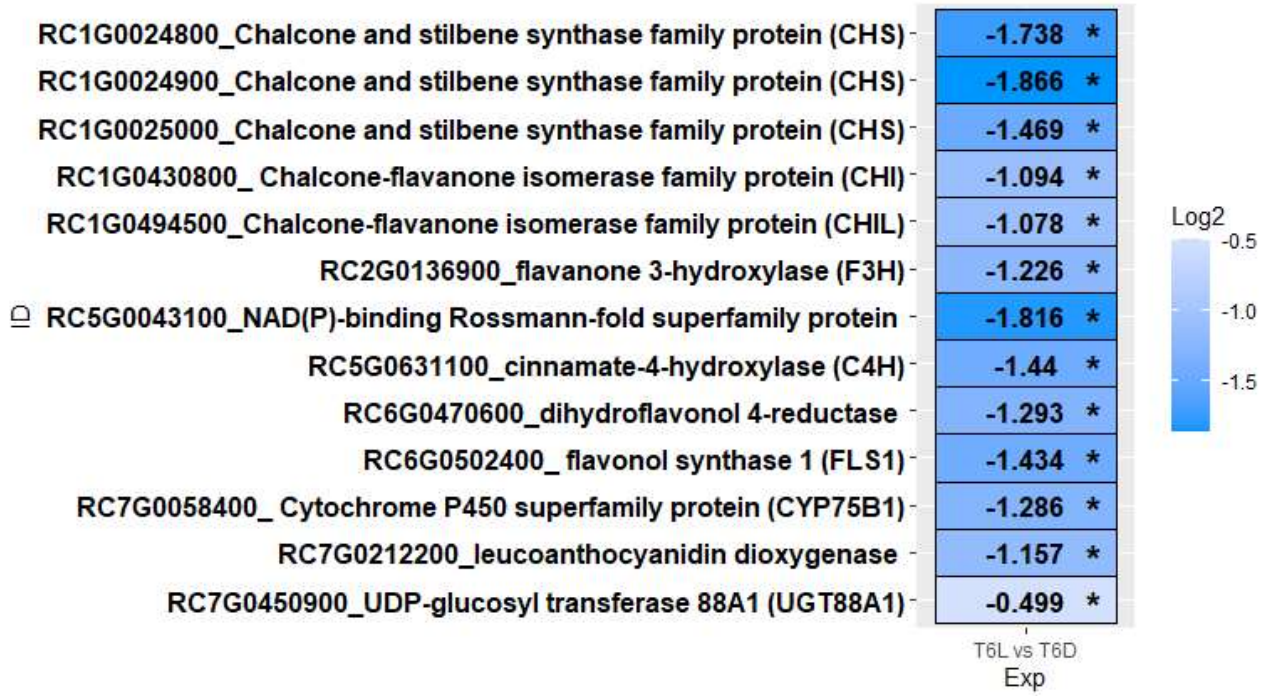

Figure 40 : **Variation de l'expression des gènes DE à l'obscurité (t6D) par rapport à la condition lumière (t6L), associés à la biosynthèse des flavonoïdes.** Comparaison de l'expression en Log2 Fold Change des gènes dans le bourgeon de rosier, 6 heures après décapitation à l'obscurité (Bleu : gènes sous-exprimés, Rouge : gènes surexprimés). Les astérisques représentent les différences significatives (p.adj≤0.05).

En conclusion, il y aurait une forte régulation des processus métaboliques à la lumière ainsi qu'à l'obscurité. De plus, nous confirmons qu'il y aurait une reprise de l'activité cellulaire à la lumière, 6 heures après décapitation. Nous avons regardé les fonctions biologiques des gènes induits ou réprimés soit à la lumière soit à l'obscurité uniquement, 6 heures après décapitation. Nous allons maintenant nous intéresser plus en détail aux voies métaboliques dans lesquelles ces gènes sont impliqués.

2.5.2. Analyse des voies métaboliques selon la base de données KEGG

La Figure 43 représente le nombre de gènes différentiellement exprimés à la lumière ou à l'obscurité uniquement par rapport à t0 impliqués dans des voies métaboliques. Nous pouvons observer tout d'abord que nous retrouvons plusieurs voies déjà caractérisées dans le contrôle du débourrement suite à la levée de la dominance apicale par décapitation de l'apex comme la signalisation hormonale, le métabolisme des sucres, la reprise du cycle cellulaire et l'activité de transcription. Notre analyse précédente a permis de mettre en évidence de nouvelles voies comme le métabolisme des lipides en réponse à la décapitation (Partie 2.2., Figure 34). Ici nous pouvons observer 8 gènes induits ou réprimés à la lumière qui sont impliqués spécifiquement dans le métabolisme des glycerolipides. Cette voie métabolique n'a pas encore été démontrée comme étant impliquée dans le contrôle du débourrement et serait en commun entre les processus liés à la décapitation et au photo-contrôle. Cette voie pourrait être intéressante à étudier. Les glycérolipides sont des composants majeurs des membranes photosynthétiques et ont un rôle dans la photosynthèse (Aronsson, 2008 ; Boudière et al., 2014). De plus, le gène *DGD* est impliqué dans la voie des glycerolipides. Il a été montré qu'une perte de fonction de ce gène entraîne un phénotype de type *dwarf* avec un fort retard de croissance et une inflorescence très petite et peu développée (Yu et al., 2020). De plus, ce gène chez le rosier est réprimé à la lumière selon les résultats de notre séquençage. Le métabolisme lipidique pourrait donc avoir un rôle dans le développement de l'architecture des plantes.

Après avoir étudié les voies métaboliques régulées à la lumière 6 heures après décapitation, nous nous intéressons aux voies régulées à l'obscurité (Figure 43). Nous pouvons noter que nous retrouvons les mêmes voies que les voies étudiées dans la partie précédente sur le photo-contrôle (Partie 2.4.). Nous pouvons observer à l'obscurité qu'il y a 12 gènes différentiellement exprimés impliqués dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes. De plus, nous pouvons voir qu'il y a davantage de gènes impliqués dans le métabolisme de plusieurs acides aminés à l'obscurité par rapport à la lumière (Figure 43). Le rôle inducteur de l'asparagine dans le contrôle du débourrement a déjà été démontré chez le rosier (Le Moigne et al., 2018) mais il pourrait être intéressant d'étudier le rôle d'autres acides aminés dans le contrôle du débourrement.

Nous nous sommes intéressé de façon plus détaillée à deux voies très bien caractérisées dans le contrôle du débourrement : la voie hormonale (dont 13 gènes induits ou réprimés sont impliqués dans le signal hormonal, Figures 44 et 45) et la voie des sucres (dont 7 gènes sont impliqués dans le métabolisme du saccharose et de l'amidon, Figure 47 et 48).

2.5.2.1. Voie des hormones

Pour la transduction du signal hormonal en réponse à la lumière ou à l'obscurité, nous pouvons noter que des gènes différentiellement exprimés sont impliqués dans la voie de signalisation de l'auxine, des cytokinines, de l'ABA, des brassinostéroïdes, des gibbérellines et des jasmonates (Figure 46).

Tout d'abord, nous pouvons observer qu'une majeure partie de la voie de la transduction du signal auxinique est significativement réprimée à la lumière par rapport à t0. En effet, *AUX1*, *IAA14*, *ARF11* et des gènes *SAUR* sont significativement réprimés (Figure 46 A). Un des gènes *SAUR* est le gène le plus réprimé par la lumière (5 fois moins exprimé par rapport à t0). Il a été montré chez le chrysanthème que la quantité d'auxine diminuait très fortement dès 6 heures après décapitation (Sun et al., 2021). Lorsque la quantité d'auxine est faible, les protéines IAA/AUX se lient avec les ARFs et interfèrent avec leur activité transcriptionnelle. Cela conforte donc nos résultats, nous pouvons nous attendre que chez le rosier, une diminution de la quantité d'auxine dans le bourgeon entraîne une répression de l'activité des ARFs, diminuant alors l'expression de gènes de réponse à l'auxine. Au contraire, à l'obscurité, la voie de signalisation de l'auxine est cette fois-ci induite (contrairement à la lumière) excepté pour le gène *GH3* qui est réprimé (2 fois moins exprimé). De façon intéressante, nous pouvons noter que ce ne sont pas les mêmes gènes qui sont réprimés à la lumière et qui sont induits à l'obscurité, suggérant que ce ne sont pas strictement les mêmes voies qui sont régulées par la lumière et l'obscurité mais plutôt des voies proches. Nous retrouvons les mêmes gènes étudiés dans la partie précédente sur le photo-contrôle strict.

Pour la signalisation des cytokinines, nous pouvons observer que les *ARR* semblent être régulés par la lumière. Un gène codant un ARR de type B est réprimé (deux fois moins exprimé par rapport à t0). Les ARR de type B sont inhibés par les ARR de type A dont l'un est surexprimé (environ 2.5 fois plus exprimés), ce qui est concordant avec les résultats de Roman et al., (2016) où un gène codant un ARR de type A (*RhARR3*) est surexprimé à la lumière 6 heures après décapitation (Figure 46 B). Ces résultats sont également concordants avec une étude réalisée chez le chrysanthème où un gène codant un ARR de type A est surexprimé et 4 gènes codants des ARR de type B sont réprimés dans des bourgeons 48 heures après décapitation (Sun et al., 2021). Donc, selon nos résultats, nous pouvons nous attendre à une augmentation de la signalisation CK 6 heures après décapitation à la lumière.

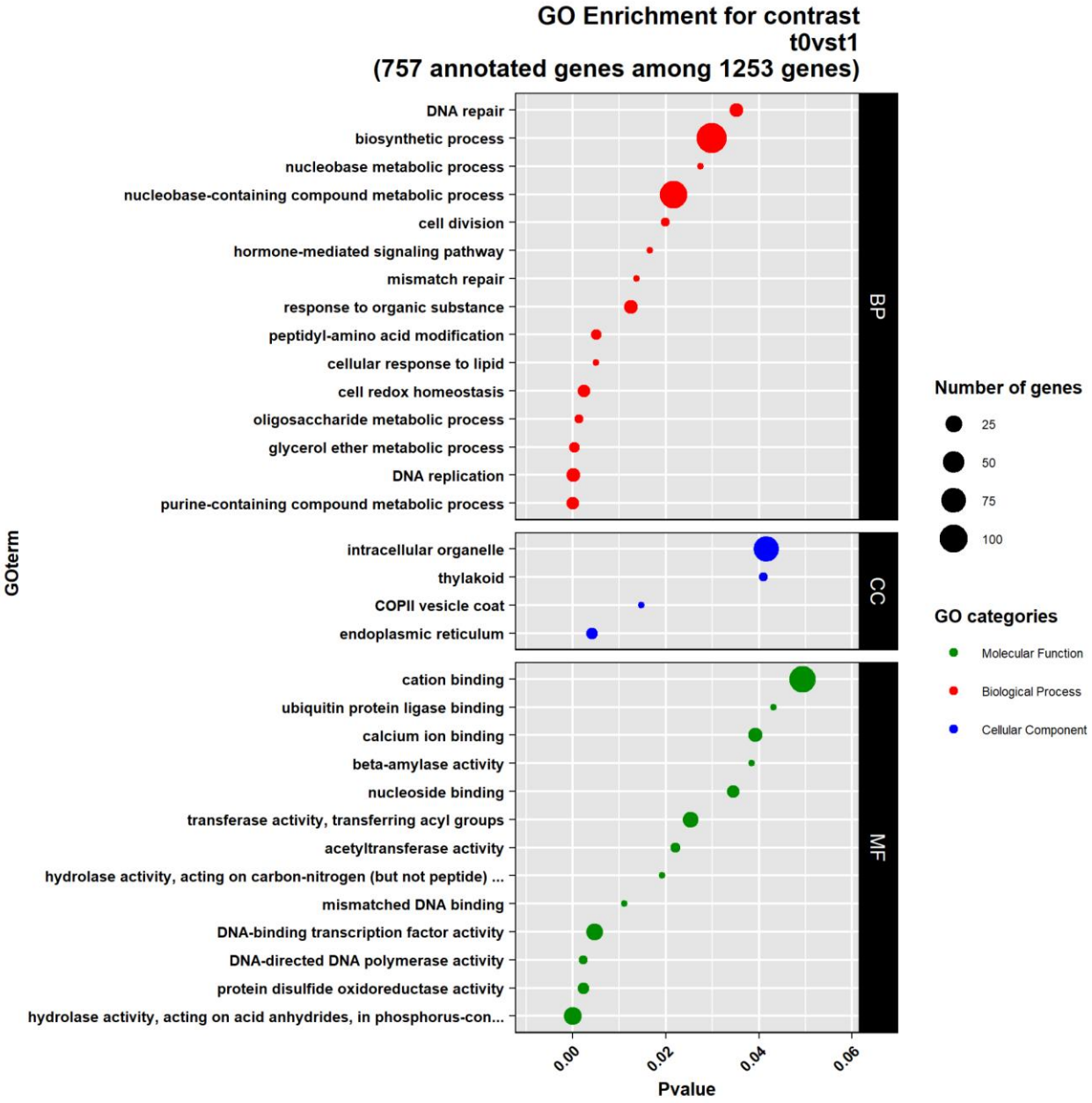

Figure 41 : **Analyse des termes GO des 1253 gènes différentiellement exprimés dans les bourgeons 3 de plantes cultivées 6 heures à la lumière après décapitation (t6L) comparé au moment juste après décapitation (t0).** Analyse des termes GO significativement enrichis des gènes différentiellement exprimés. (t1 signifie t6L, p≤0.05)

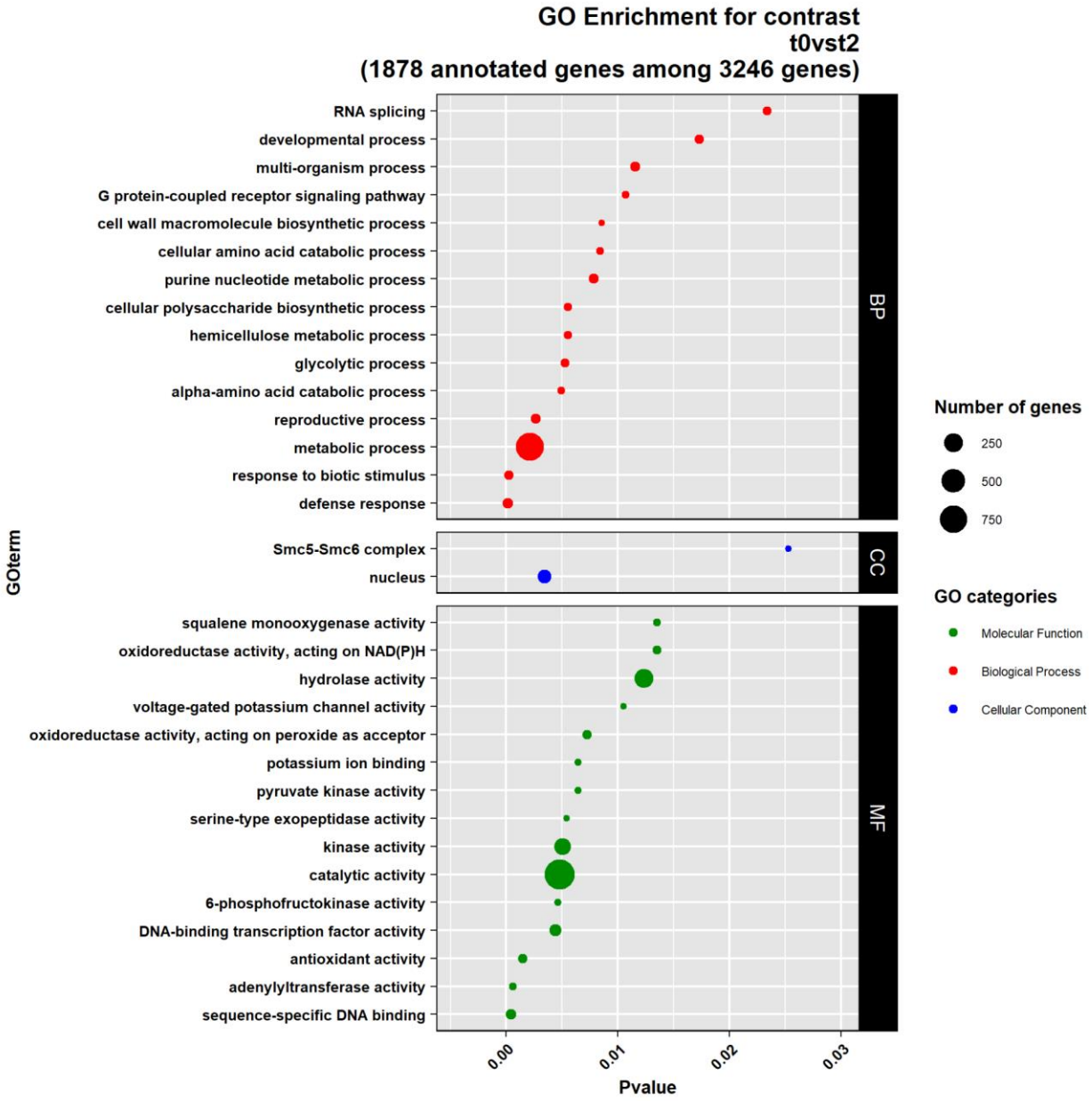

Figure 42 : **Analyse des termes GO des 3246 gènes différentiellement exprimés dans les bourgeons 3 de plantes cultivées 6 heures à l'obscurité (t6D) après décapitation comparé au moment juste après décapitation (t0).** Analyse des termes GO significativement enrichi des gènes différentiellement exprimés (p≤0.05) (t2 signifie t6D).

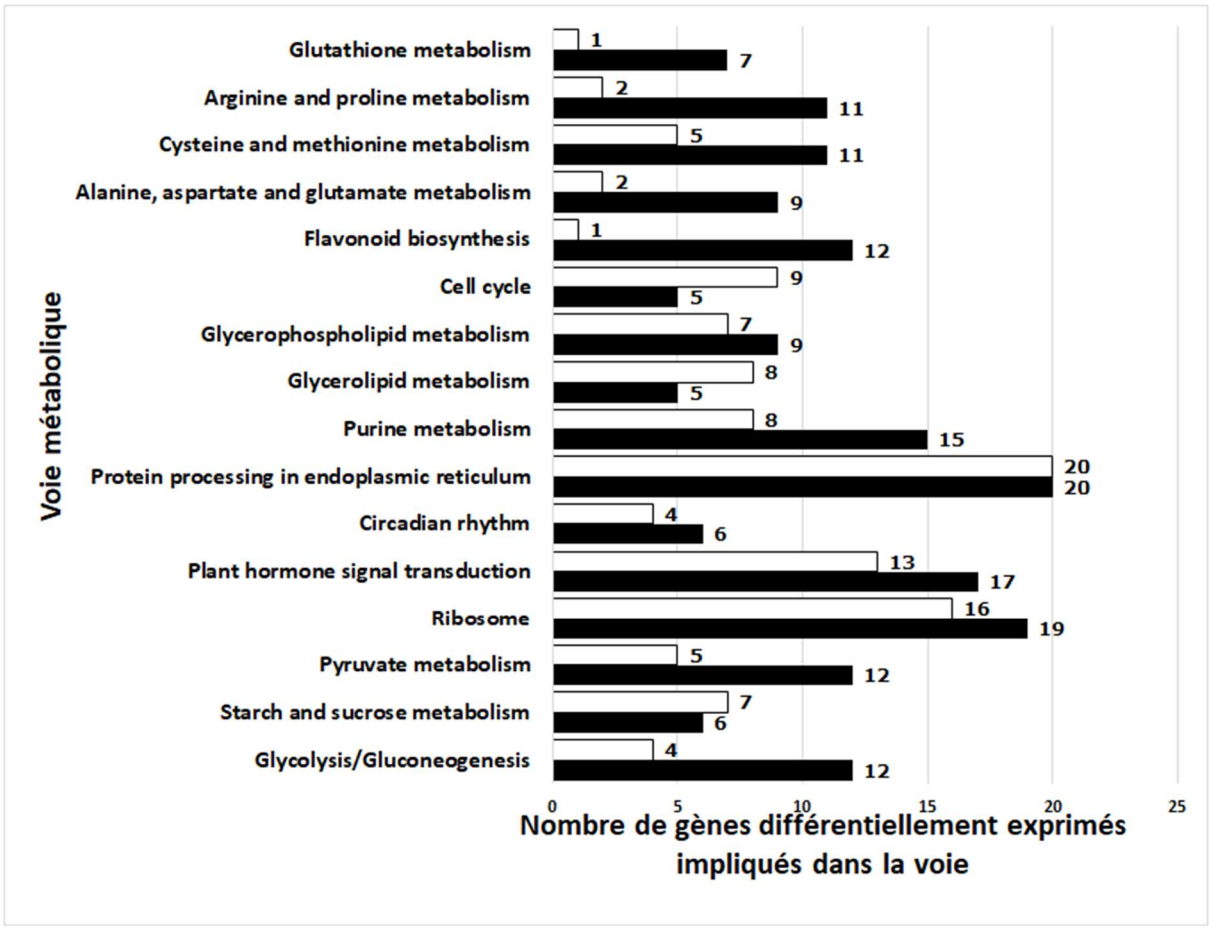

Figure 43 : **Nombre de gènes différentiellement exprimés strictement à la lumière ou strictement à l'obscurité uniquement par rapport au moment juste après décapitation (t0) impliqués dans les voies métaboliques définies selon KEGG.** Les histogrammes blancs représentent les gènes DE à la lumière par rapport à t0 et en noir les gènes DE à l'obscurité par rapport à t0.

Alors qu'à l'obscurité, le gène codant la protéine CRE1 est réprimé (environ deux fois moins exprimé), ainsi qu'un gène codant une protéine ARR de type B (différente du gène induit à la lumière) est lui induit (environ 2.5 fois plus exprimé) (Figure 46 B).

Egalement, nous pouvons voir qu'à l'obscurité par rapport à t0, la voie de l'ABA est induite en amont, le gène *PYL5* est le gène le plus surexprimé (26 fois plus exprimé) qui ensuite inhibe les protéines PP2C dont les gènes sont réprimés à l'obscurité (Figure 46 C). Nous retrouvons les mêmes gènes étudiés dans la partie précédente sur le photo-contrôle strict : les gènes *PYR/PYL* et *PP2C* (RC1G484500, RC1G0509200, et RC5G0571100).

Pour la voie des BR, nous retrouvons les mêmes gènes *BZR1* et *TCH4* (RC2G0165800 et RC4G0096600) qui sont induits à l'obscurité (t6D) par rapport à la condition lumière (t6L). Le gène *BZR1* est ici réprimé à la lumière par rapport à t0 (deux fois moins exprimé, Figure 46 D). Nous pouvons également noter que les gènes *BSK* (*BRASSINOSTEROID-SIGNALING KINASE 1*) et *TCH4* (*TOUCH 4)* impliqués dans la signalisation des BR sont induits à l'obscurité par rapport à t0. Le gène *BSK* est impliqué dans la signalisation des BR et dans l'immunité chez *Arabidopsis* (Shi et al., 2013 ; Yan et al., 2018). Cela confirme notre hypothèse que les BR auraient un rôle inhibiteur du débourrement et leur signalisation serait donc inhibée à la lumière après décapitation.

Enfin en ce qui concerne la voie de signalisation des gibbérellines, seul le gène *GID2,* dont la protéine inhibe les protéines DELLA, est sous-exprimé à la lumière par rapport à t0 (environ deux fois moins, Figure 46 F). Egalement, les gènes *GID1* et *PIF3* sont réprimés à l'obscurité (environ deux fois moins exprimés). Cependant, il a été montré que les protéines DELLA sont inhibitrices de la signalisation GA. Nous observons une répression de l'expression de *GID2* à la lumière, ce qui pourrait entraîner une diminution de la quantité des protéines GID2, levant leur répression sur les protéines DELLA. Alors que nous observons une répression de l'expression de *GID1* à l'obscurité entraînant donc une répression de l'activité des protéines DELLA et donc entraînerait une activation de la signalisation des GA à l'obscurité. Ces résultats suggèrent que les GA seraient inhibitrices du débourrement. Or, il a été montré chez le rosier que la synthèse de GA était induite à la lumière après décapitation, les GA auraient un rôle activateur du débourrement, ce qui n'est pas concordant avec nos résultats (Choubane et al., 2012).

De plus, concernant la voie des jasmonates, le gène *COI1* est réprimé à la lumière (1.36 fois moins exprimé, Figure 46 G). Cette protéine réprime le gène *JAZ*, dont nous pouvons observer l'induction à la lumière, 6 heures après décapitation (environ 4 fois plus exprimés). Les jasmonates étant considérés comme une hormone de réponse à une blessure, l'induction du gène JAZ pourrait être une réponse à la blessure associée à la décapitation.

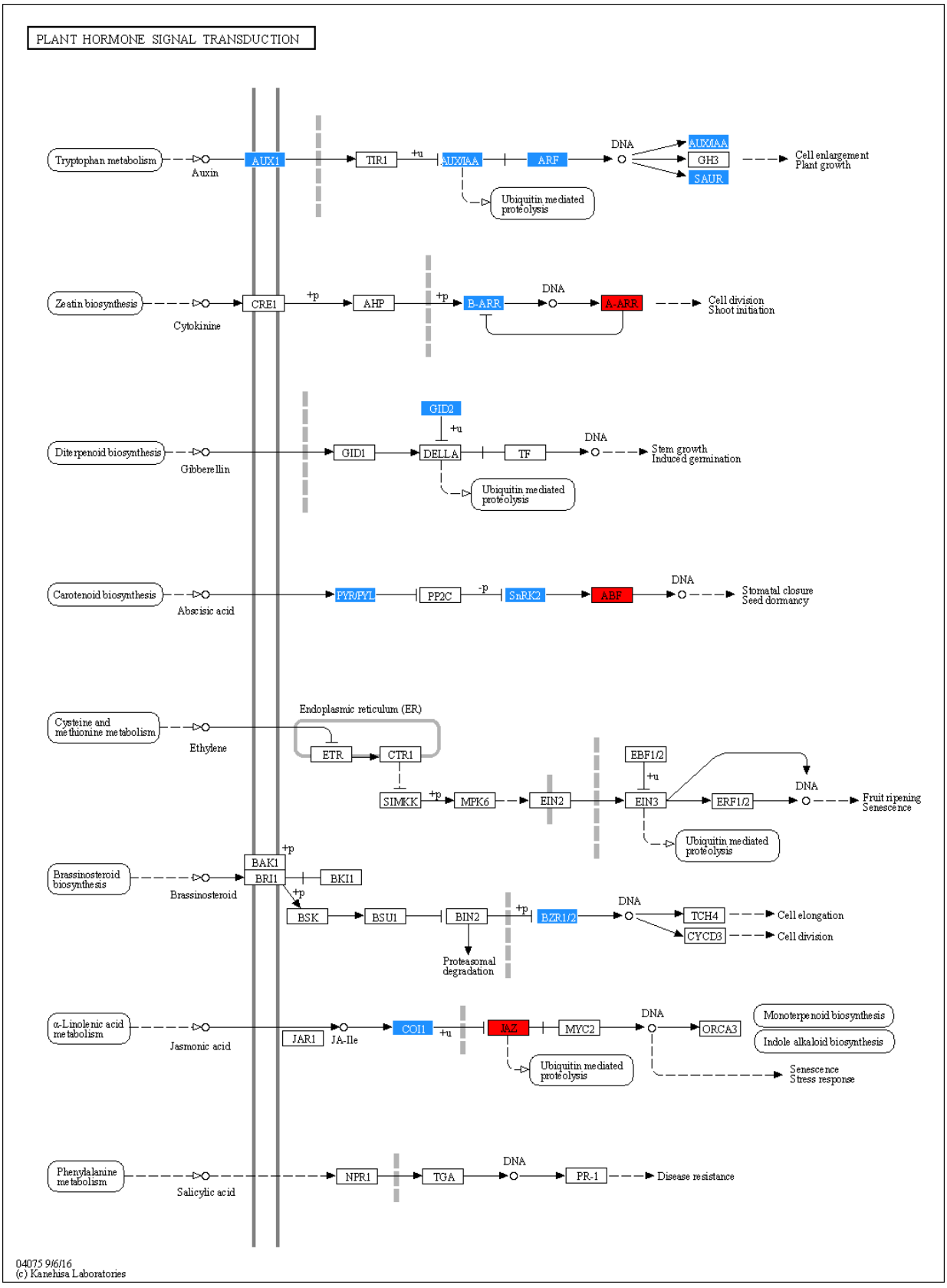

Figure 44 : **Gènes impliqués dans la signalisation des hormones significativement différentiellement exprimés à la lumière, 6 heures après décapitation (t6L) par rapport à t0.** (Bleu : sous-exprimés, Rouge : surexprimés).

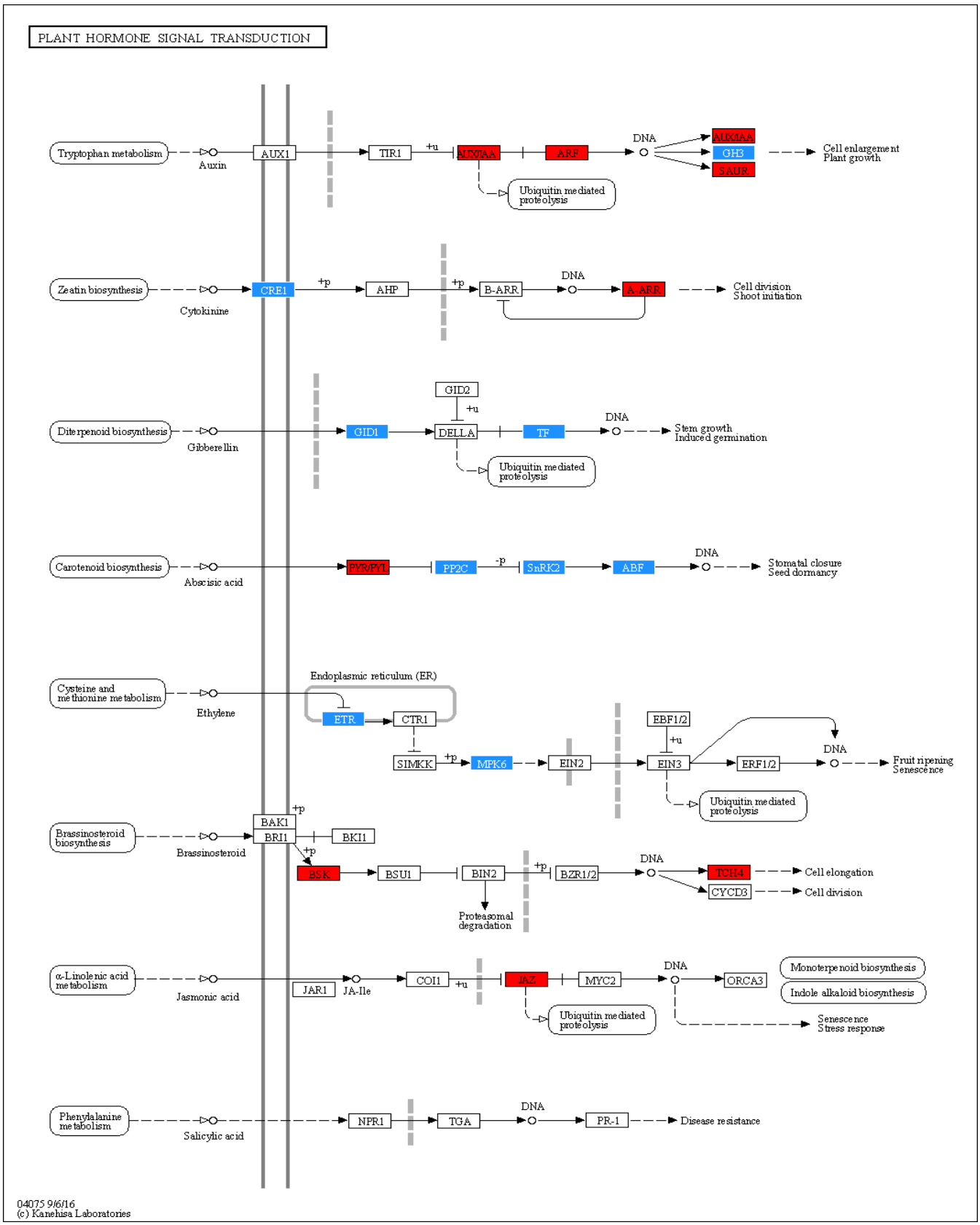

Figure 45 : **Gènes impliqués dans la signalisation des hormones significativement différentiellement exprimés à l'obscurité, 6 heures après décapitation (t6D) par rapport à t0.** (Bleu : sous-exprimés, Rouge : surexprimés)

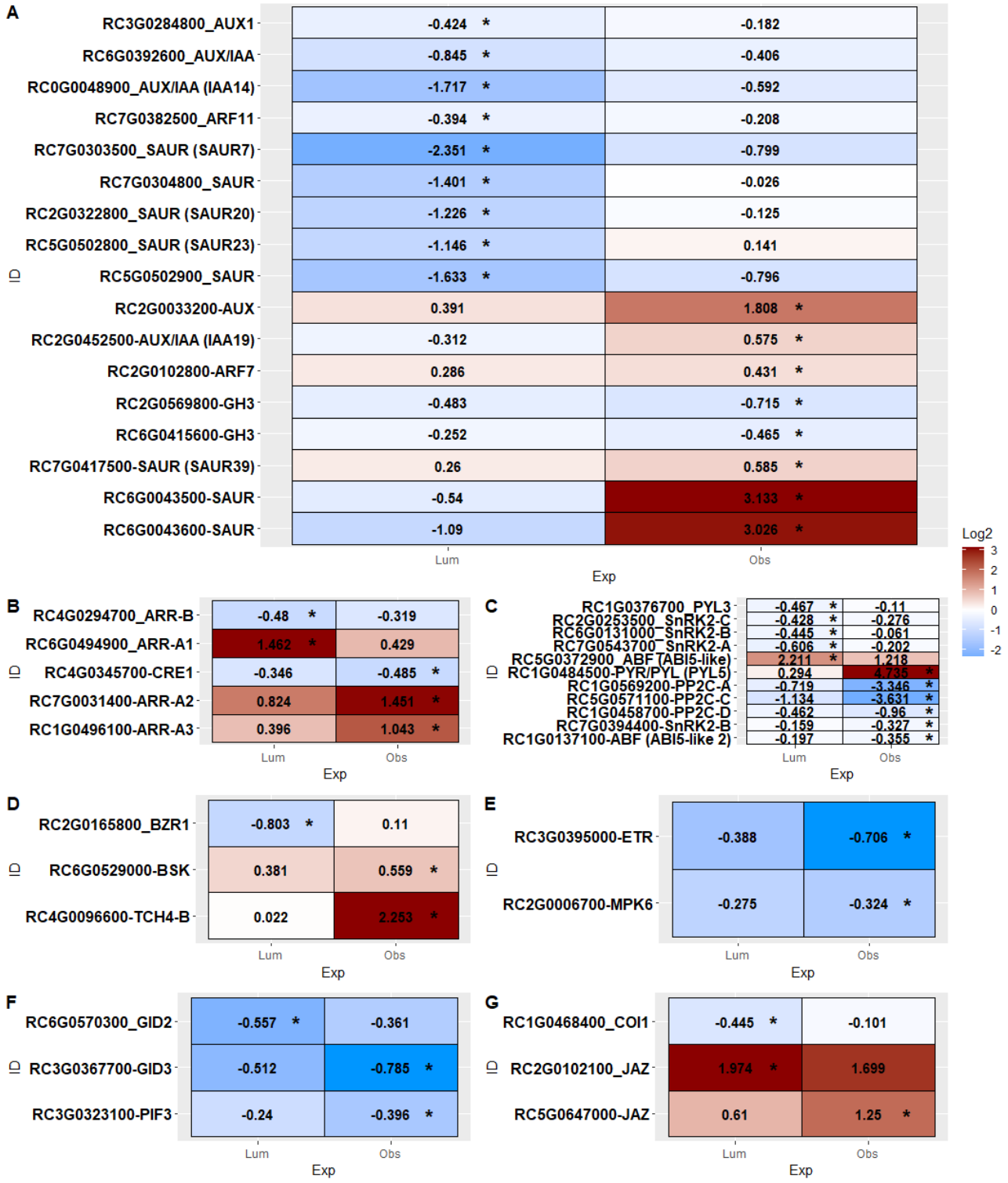

Figure 46 : ***Variation de l'expression des gènes différentiellement exprimés à la lumière ou à l'obscurité, associés à la transduction du signal de différentes hormones, au cours des phénomènes précoces du débourrement après décapitation*.** Comparaison de l'expression en Log2 Fold Change des gènes dans le bourgeon de rosier, 6 heures après décapitation à la lumière ou à l'obscurité par rapport à t0 (Bleu : gène sous-exprimé, Rouge : gène surexprimé). Les astérisques représentent les différences significatives (p.adj≤0.05). A : Voie de signalisation de l'auxine. B : Voie de signalisation des cytokinines. C : Voie de signalisation de l'ABA. D : Voie de signalisation des brassinostéroïdes. E : Voie de signalisation de l'éthylène. F : Voie de signalisation des gibbérellines. G : Voie de signalisation des jasmonates.

En conclusion, selon nos analyses, le débourrement en réponse à la lumière à des temps courts serait associé à une répression de la voie de signalisation de l'auxine et des brassinostéroïdes et une activation de la signalisation des CK, des GA et des jasmonates.

De plus, nous ne retrouvons pas les voies des gibbérellines et des jasmonates dans l'étude du photo-contrôle strict, nous pouvons émettre l'hypothèse que ces voies sont sous photo-contrôle et contrôle temporel ou bien en relation avec un effet blessure.

L'ensemble de ces gènes différentiellement exprimé à la lumière ou à l'obscurité, 6 heures après décapitation, sont impliqués dans des voies déjà caractérisées dans le contrôle du débourrement mais leur fonction précise n'a pas encore été déterminée. Cette analyse transcriptomique nous permet d'apporter des informations complémentaires sur leur rôle dans les phases précoces du contrôle du débourrement chez le rosier.

Après avoir analysé en détail les gènes différentiellement exprimés dans la signalisation des hormones, nous nous intéressons maintenant à une deuxième voie métabolique : le métabolisme des sucres.

2.5.2.2. Voie des sucres

Concernant le métabolisme des sucres à la lumière par rapport à t0, le gène (RC4G0422100) qui code une beta glucosidase 40 est le gène le plus réprimé (environ 2.5 fois moins exprimé) et le gène codant une beta amylase est le plus surexprimé à la lumière (environ 1.8 fois plus exprimé). Nous pouvons observer qu'un gène codant une invertase pariétale (RC0G0091400 *CWINV1*) est surexprimé à la lumière (Figure 49). Cela est concordant avec le rôle signal des sucres dans le contrôle du débourrement et ce qui a été montré précédemment. En effet, il a été montré que l'activité d'une invertase pariétale (IVP) augmente après décapitation à la lumière (Girault, 2009). Malgré le fait qu'il existe peu de travaux sur l'implication des invertases pariétales dans le débourrement, il a été montré que l'activité de l'invertase pariétale augmente fortement juste avant le débourrement chez des bourgeons de pêcher (Maurel et al., 2004).

Par ailleurs, nous pouvons noter avec intérêt une régulation centrée sur le tréhalose-6-phosphate. En effet, le gène codant la tréhalose-6-phosphate phosphatase J (*TPPJ*) est réprimé par la lumière (environ 2.5 fois moins exprimé) alors que le gène tréhalose-6-phosphate synthase *TPS1* (RC5G0260100) est lui induit (environ 1.35 fois plus exprimé) (Figure 49). Cela entraînerait une augmentation du niveau de T6P dans le bourgeon. Il a été montré qu'une surexpression de *AtTPS1* entraîne une augmentation de la quantité de T6P alors qu'une surexpression de *AtTPPF* entraîne une diminution de la quantité de T6P et une augmentation de tréhalose (Avonce et al., 2004 ; Lin et al., 2019).

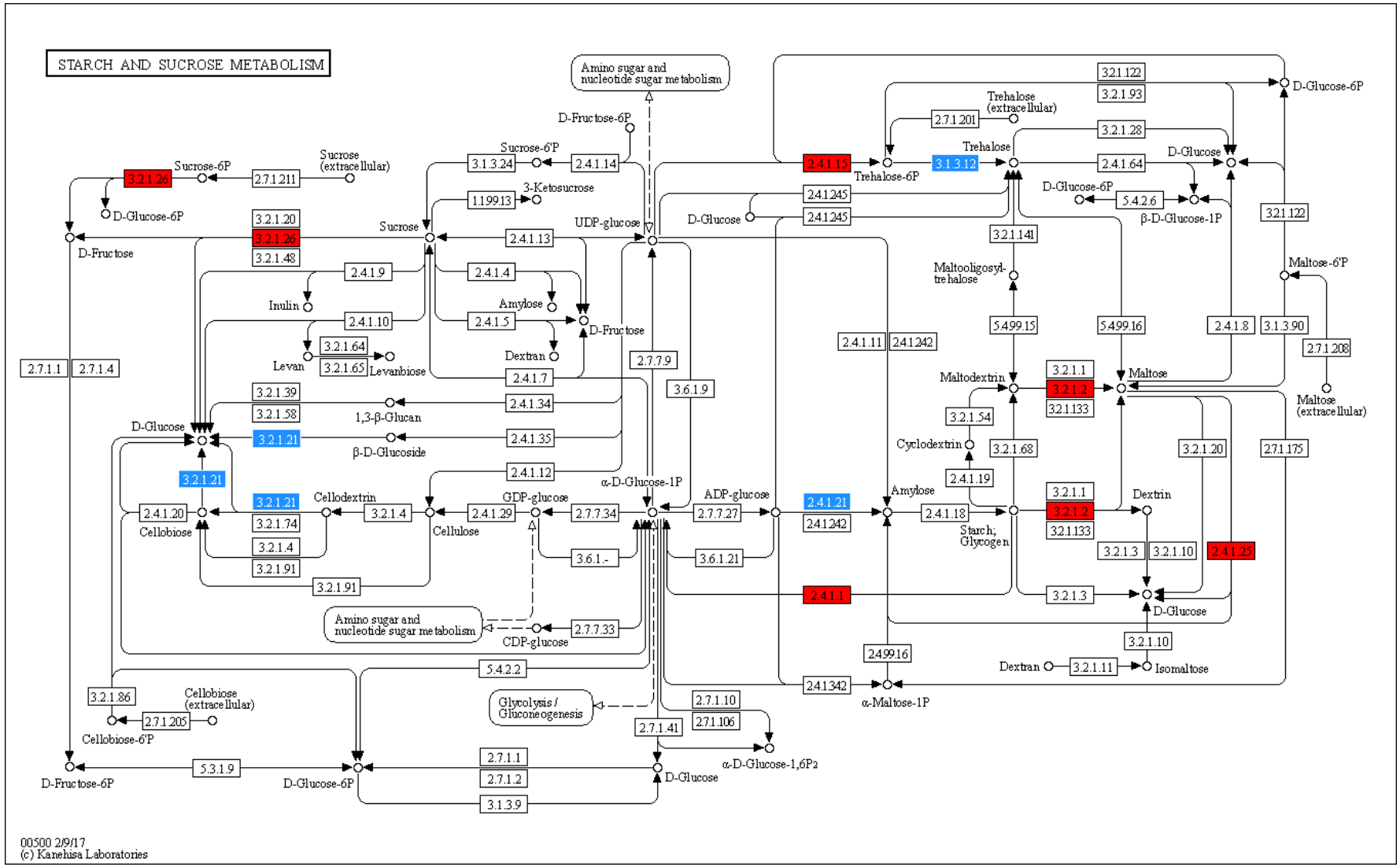

Figure 47 : **Gènes impliqué dans le métabolisme de l'amidon et du saccharose significativement différentiellement exprimés à la lumière.** La figure représente les gènes DE à la lumière par rapport au moment juste après décapitation (t0). (Bleu : sous-exprimés, Rouge : surexprimés).

Selon Pellny et al., (2004), le trehalose-6-phosphate est synthétisé à partir de Glucose-6-phosphate et d'UDP-glucose par la trehalose-6-phosphate synthase (TPS) puis le T6P est transformé en tréhalose par la tréhalose-phosphate-phosphatase (TPP ; Figure 50). Il a été montré que la quantité de T6P augmente après décapitation de l'axe principal et permet l'initiation du débourrement du bourgeon axillaire chez le pois (Fichtner et al., 2017). Il semble donc logique de voir dans notre séquençage dans les phases précoces du débourrement une induction de l'expression du gène de synthèse du T6P *TPS* et une diminution de l'expression du gène *TPP* afin de maintenir la quantité de T6P afin qu'il ne soit pas transformé en tréhalose. Cette modification précoce de l'expression de ces gènes indique que le T6P pourrait agir comme molécule signale précoce du débourrement.

Après avoir regardé l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des sucres à la lumière, nous nous intéressons aux gènes différentiellement exprimés à l'obscurité, impliqués dans ce métabolisme (Figure 51).

Nous pouvons observer que onze gènes sont réprimés à l'obscurité en particulier dans le métabolisme du saccharose. En effet, nous pouvons noter que l'invertase vacuolaire *VI2* déjà étudiée par l'équipe (RC7G0234000) est cette fois-ci réprimée par l'obscurité (environ 3 fois moins exprimée, Figure 51). Le gène *VI2* est exprimé chez les jeunes feuilles d'*Arabidopsis* et très peu dans les feuilles matures (Mitsuhashi et al., 2004). Chez le rosier, ce gène est exprimé très tardivement et faiblement dans les bourgeons (deux fois plus exprimé 72h après décapitation à la lumière ; Rabot et al., 2012). Nous n'avons pas identifié ce gène comme différentiellement exprimé à la lumière, ce qui est concordant avec cette étude. Cela est également concordant avec les observations de Girault et al., (2008) montrant l'inhibition de l'organogenèse foliaire au sein des bourgeons à l'obscurité. La répression de cette invertase inhiberait le développement des primordia foliaires au sein du bourgeon à l'obscurité.

Le gène le plus réprimé de la voie du saccharose est un gène codant une tréhalose 6-phosphate phosphatase (*TPPD1*) (12 fois moins exprimé), il est à noter qu'un autre gène *TPP* (*TPPJ*) est réprimé à la lumière (Figure 49). Il y aurait donc une photo-régulation fine entre plusieurs gènes codant la même protéine, la protéine TPP.

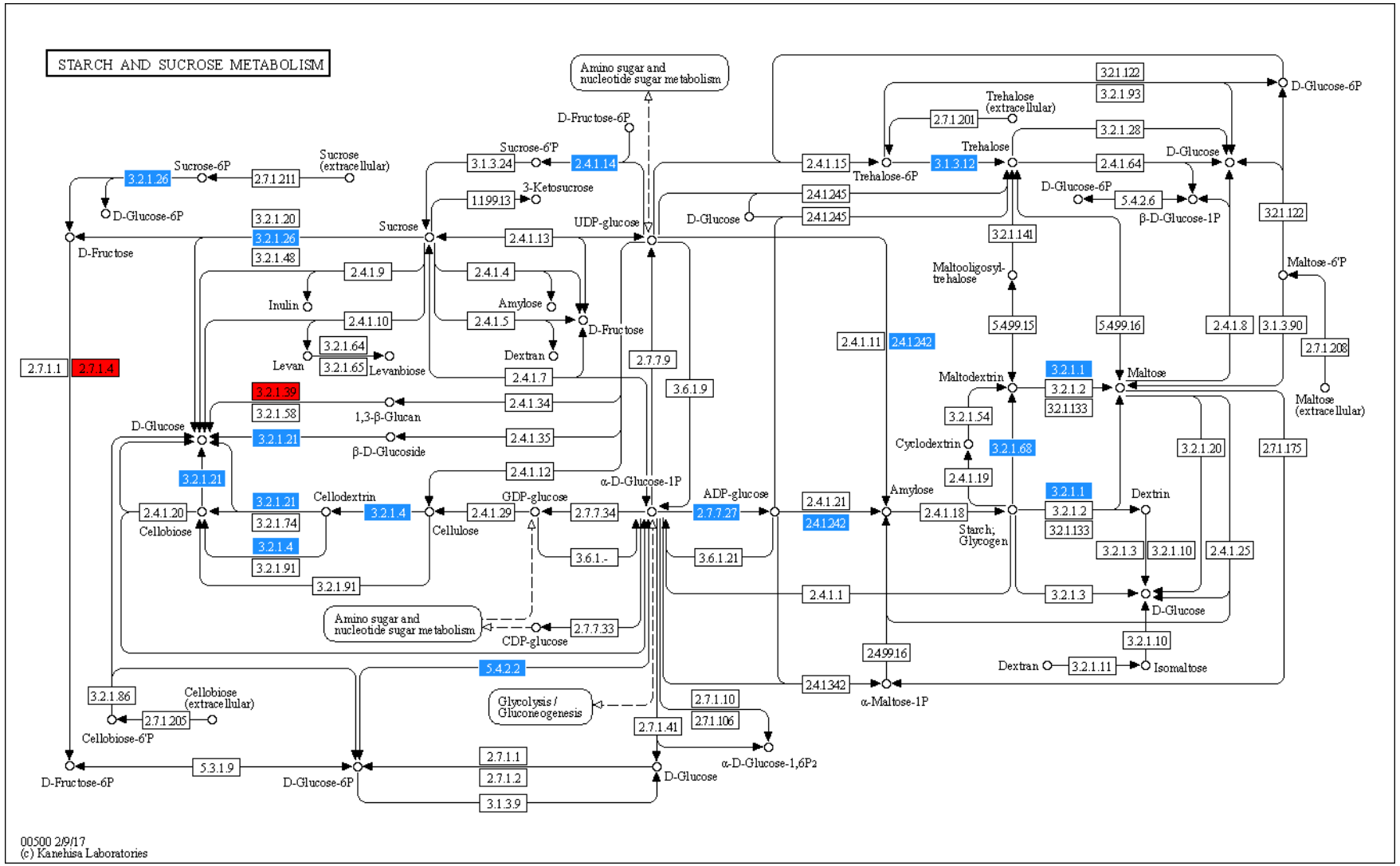

Figure 48 : **Gènes impliqué dans le métabolisme de l'amidon et du saccharose significativement différentiellement exprimés à l'obscurité.** La figure représente les gènes DE à l'obscurité par rapport au moment juste après décapitation (t0). (Bleu : sous-exprimés, Rouge : surexprimés).

2.5.2.3. Voie des flavonoïdes

Après avoir étudié des voies métaboliques connus dans le contrôle du débourrement (hormones et sucres), nous nous intéressons à une nouvelle voie métabolique qui n'a pas été étudiée dans le cadre du contrôle du débourrement et pour laquelle nous avons identifié un nombre important de gènes différentiellement exprimés à l'obscurité : la synthèse des flavonoïdes (Figure 52). Ainsi, nous pouvons voir Figure 53 que 16 gènes différentiellement exprimés à l'obscurité seraient impliqués dans la biosynthèse des flavonoïdes. Nous retrouvons 12 gènes en commun avec les gènes réprimés à l'obscurité par rapport à la condition lumière (Partie 2.4.2.2.). Nous retrouvons notamment les gènes *CHS* et *CYP75B1*.

En conclusion, toutes les analyses de fonctions biologiques et voies métaboliques des gènes différentiellement exprimés dans nos différentes comparaisons nous ont permis de mettre en avant de nouveaux gènes ayant un rôle potentiel dans le contrôle précoce du débourrement. Ces gènes sont impliqués dans des voies connues du contrôle du débourrement comme les hormones ou les sucres, mais nous avons mis également en avant de nouvelles voies métaboliques comme le métabolisme des lipides ou des flavonoïdes. Après avoir identifié de nouveaux candidats, nous souhaitons étudier les gènes déjà identifiés par l'équipe dans le contrôle du débourrement afin d'observer si nos résultats corroborent avec ce qui a déjà été démontré par l'équipe.

2.6. Approche basée sur les données de la littérature : expression des gènes déjà caractérisés par l'équipe dans l'étude du contrôle du débourrement

Nous souhaitons voir si nous retrouvons un comportement similaire à ce qui a été montré dans la littérature des travaux de l'équipe. Néanmoins, il est difficile de comparer les résultats du séquençage avec les précédents résultats de l'équipe. En effet, la plupart des études réalisées par l'équipe portent sur des conditions de traitements différents (culture *in vitro*, plantes défoliées) et sur des temps plus tardifs.

Une liste de ces gènes étudiés pour le contrôle du débourrement chez le bourgeon de rosier a été établie (Tableau V). Cette liste regroupe les gènes liés à la synthèse, transport, signalisation et dégradation des différents acteurs internes principaux dans le contrôle du débourrement étudié chez le rosier : les hormones (Aux, CK, SL, GB), les sucres, les ROS ainsi que les gènes liés au cycle cellulaire et la croissance.

L'expression de ces gènes a été étudiée dans le séquençage des ARNm grâce à une analyse d'expression différentielle afin d'explorer si leur profil d'expression corrobore les résultats précédemment publiés. L'expression en "Fold Change" de ces gènes est décrite Figure 54.

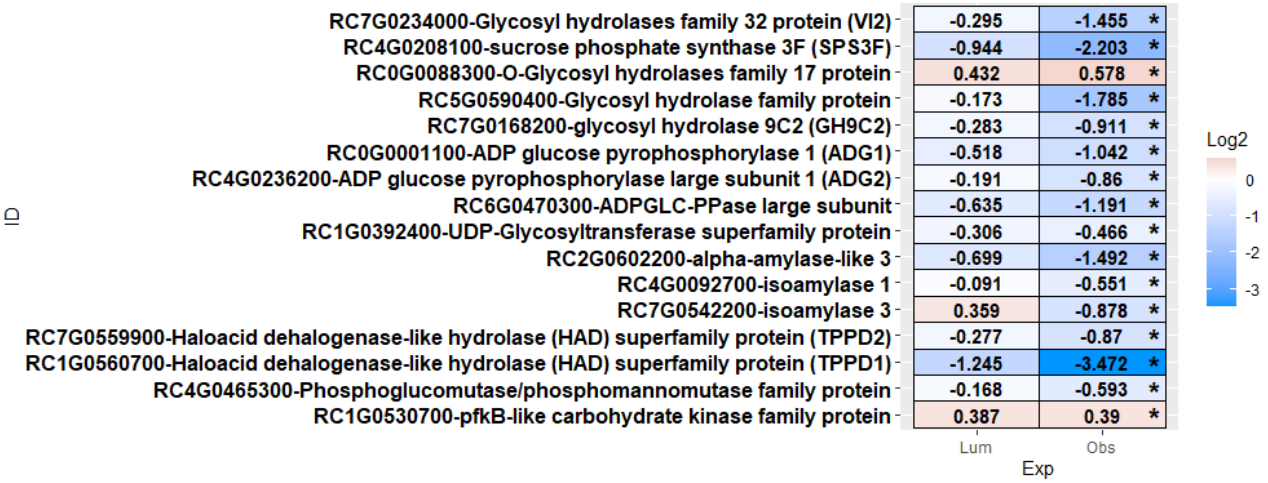

Figure 49 : **Evolution de l'expression des gènes différentiellement exprimés à la lumière, associés au métabolisme du saccharose et de l'amidon, au cours des phénomènes précoces du débourrement après décapitation.** Comparaison de l'expression en Log2 Fold Change des gènes dans le bourgeon de rosier, 6 heures après décapitation à la lumière ou à l'obscurité par rapport à t0 (Bleu : gène sous-exprimé, Rouge : gène surexprimé). Les astérisques représentent les différences significatives (p.adj≤0.05).

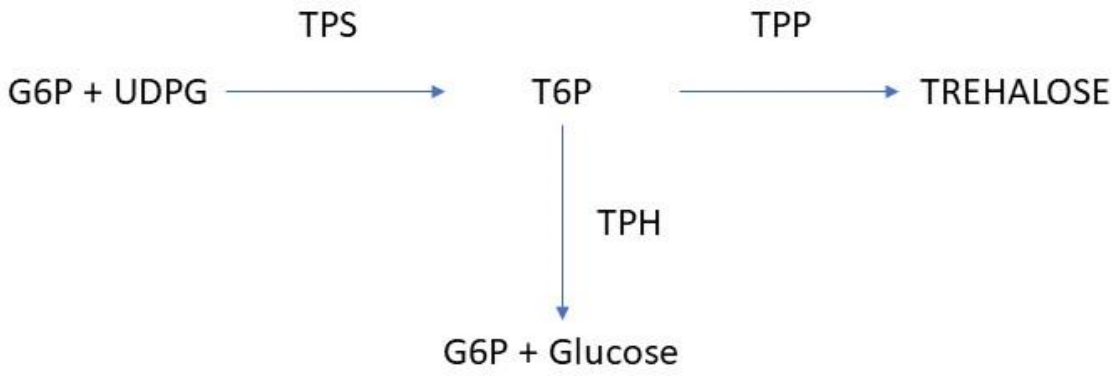

Figure 50 : **Synthèse du tréhalose-6-phosphate et du tréhalose**. Adapté de Pellny et al., 2004.

Les gènes étudiés ont été répartis en quatre groupes distincts en fonction des processus dans lesquels ils interviennent : cycle cellulaire et croissance, hormones, sucres et ROS.

Concernant les gènes liés au cycle cellulaire et croissance, cinq gènes impliqués dans les processus de divisions cellulaires et d'expansion ont été étudiés (Devitt et Stafstrom,1995 ; Shimizu & Mori, 1998 ; Roman et al., 2016 ; Roman et al., 2017). Nous pouvons remarquer que deux gènes codant des expansines, *EXPA1* et *3* sont significativement surexprimés à l'obscurité (environ deux fois plus exprimés). Trois autres gènes, *EXPA2*, *PCNA* et *CYCD3;1* ne semblent pas avoir de différentiel d'expression à la lumière ou à l'obscurité (Figure 54 A). Concernant les gènes *PCNA* et *CYCD3;1*, ces résultats sont concordants avec les études précédentes où il n'a pas été observé d'expression significative de ces gènes 6 heures après décapitation. Cependant, pour le gène *EXPA3*, cela n'est pas cohérent avec les études précédentes. En effet, il a été montré que le gène *EXPA3* est réprimé 6 heures après décapitation à l'obscurité (Roman et al., 2016).

Puis concernant les hormones, nous pouvons observer dans notre séquençage que des gènes liés à la synthèse et transport d'auxine sont surexprimés (*YUCCA1* et *PIN1*) à l'obscurité. Cependant, il a été montré précédemment que *PIN1* est induit à 24 heures après décapitation au cours du débourrement (Müller & Leyser, 2011 ; Barbier et al., 2015) donc cela n'est pas cohérent avec nos résultats.

Puis, concernant les CK, leurs gènes de synthèse *RhIPT3* et de signalisation *RhARR5* sont induits à l'obscurité, alors que le gène de transport *ENT1* est lui réprimé (environ deux fois moins exprimés), ce qui conforte les résultats trouvés précédemment pour *IPT3* et *ARR5* (Roman et al., 2016).

De plus, les gènes *GA2ox* et *GA3ox* sont réprimés (environ 4 fois moins et deux fois moins exprimés respectivement) à l'obscurité, 6 heures après décapitation. Cela est concordant avec les résultats précédents pour le gène *GA2ox*. En effet, il a été montré que ce gène est réprimé à partir de 24 heures après décapitation à l'obscurité chez le rosier (Choubane et al., 2012).

Enfin, nous pouvons remarquer qu'aucun gène lié à la voie hormonale des SL ne semble être différentiellement exprimé à la lumière ou à l'obscurité. En particulier, il a été montré par l'équipe que l'expression de *RwMAX2* augmente chez les bourgeons placés à l'obscurité, alors que *RwMAX1* est induit à la lumière (Djennane et al., 2014). Cependant, cette étude a été réalisée sur des plantes défoliées et 24 heures après décapitation, nous pouvons donc émettre l'hypothèse qu'à 6 heures après décapitation, les gènes *MAX* n'ont pas d'expression significativement modifiée dans le bourgeon.

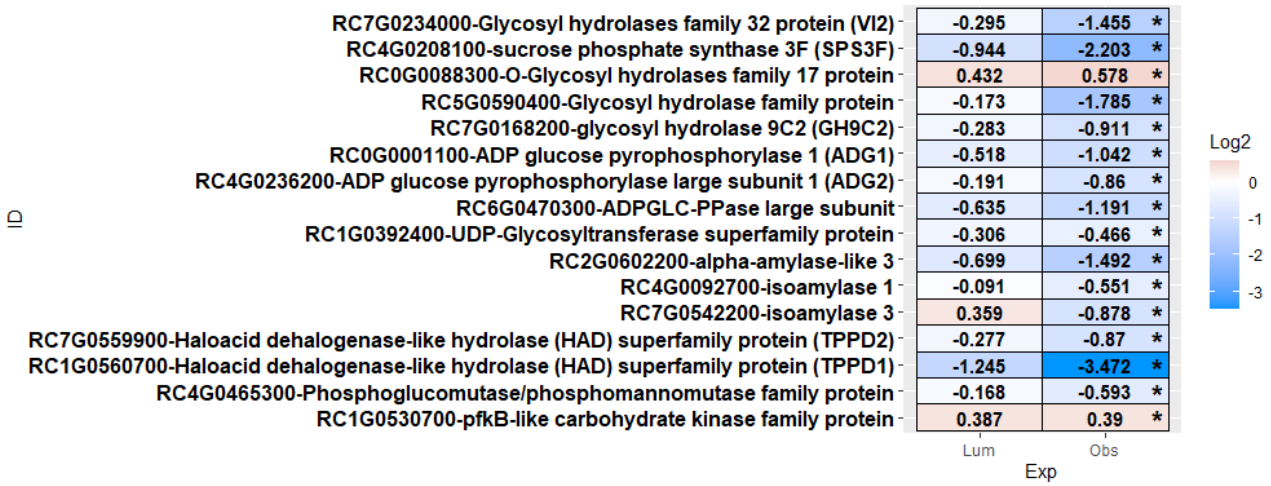

Figure 51 : **Variation de l'expression des gènes différentiellement exprimés à l'obscurité, associés au métabolisme du saccharose et de l'amidon, au cours des phases initiales du débourrement après décapitation.** Comparaison de l'expression en Log2 Fold Change des gènes dans le bourgeon de rosier, 6 heures après décapitation à la lumière ou à l'obscurité (Bleu : gène sous-exprimé, Rouge : gène surexprimé). Les astérisques représentent les différences significatives (p.adj≤0.05).

De plus, le différentiel d'expression que nous retrouvons pour la condition lumière pour *YUCCA 1* (impliqué dans la synthèse de l'auxine), *ENT1* (impliqué dans le transport des CK) et *BRC1* (intégrateur de signaux et inhibiteur du débourrement) est le même pour la condition obscurité, ce qui laisse supposer que leur expression reflète un effet "décapitation" suite à la levée de la dominance apicale (Figure 54 B). Plus précisément, pour les gènes *YUCCA1* et *ENT1*, il n'a pas été observé d'expression significative à 6 heures après décapitation, à la lumière ou à l'obscurité (Roman et al., 2016). Donc, cela n'est pas concordant avec nos résultats.

Egalement, concernant le gène *BRC1*, nous pouvons observer une répression de son expression à la lumière et à l'obscurité, cela n'est pas concordant avec ce qui a été montré précédemment, où une induction de son expression a été observée 6 heures après décapitation, sur des plantes défoliées placées auparavant 24 heures à l'obscurité (Roman et al., 2016).

Après avoir analysé les gènes impliqués dans le métabolisme des hormones, nous nous intéressons au métabolisme des sucres.

Pour ce qui est du métabolisme des sucres, le gène *NAD-SDH* est réprimé à la lumière (environ deux fois moins), ce qui confirme ce qui a été montré chez Girault et al. (2010). De plus, le gène codant l'invertase vacuolaire 2 (*VI2*) semble, lui, être réprimé à l'obscurité (environ 3 fois moins) (Figure 54 C). Cependant, le transporteur de sucre *SWEET10* est lui 16 fois plus exprimé à l'obscurité, ce qui est très différent de ce qui a été montré dans des études précédentes du laboratoire (Roman et al., 2016). Néanmoins, il a été montré que le gène *SWEET17* est induit à l'obscurité dans les racines d'*Arabidopsis* (Guo et al., 2014). Nous pouvons émettre l'hypothèse que chez le rosier, le gène *SWEET10* est induit à l'obscurité.

Et enfin, le gène *2OD*, un gène codant une oxoglutarate déshydrogénase impliquée dans le cycle de Krebs, semble répondre à un effet "décapitation" étant induit à la lumière et à l'obscurité (environ deux fois plus) mais nous retrouvons cette induction de ce gène à la lumière 24 heures après décapitation, dans l'étude de Wang et al., 2021a. Nos résultats sont donc concordants avec les travaux de l'équipe.

Et enfin concernant le métabolisme des ROS, le gène codant l'enzyme de détoxification, *APX1*, est réprimé à l'obscurité (environ deux fois moins). Concernant les *RBOHs*, nous ne pouvons pas observer une réponse "claire" de tous les membres de la famille. En effet, les *RBOHB1* et *D1* sont réprimés à l'obscurité (3 et deux fois moins exprimés). Le gène *RBOHD2* est environ 1.5 fois plus exprimé à l'obscurité alors que le gène *RBOHF* est lui 1.5 fois moins exprimé à la lumière (Figure 54 D). Concernant les *RBOHD1* et *F*, nous confirmons les résultats obtenus par Porcher et

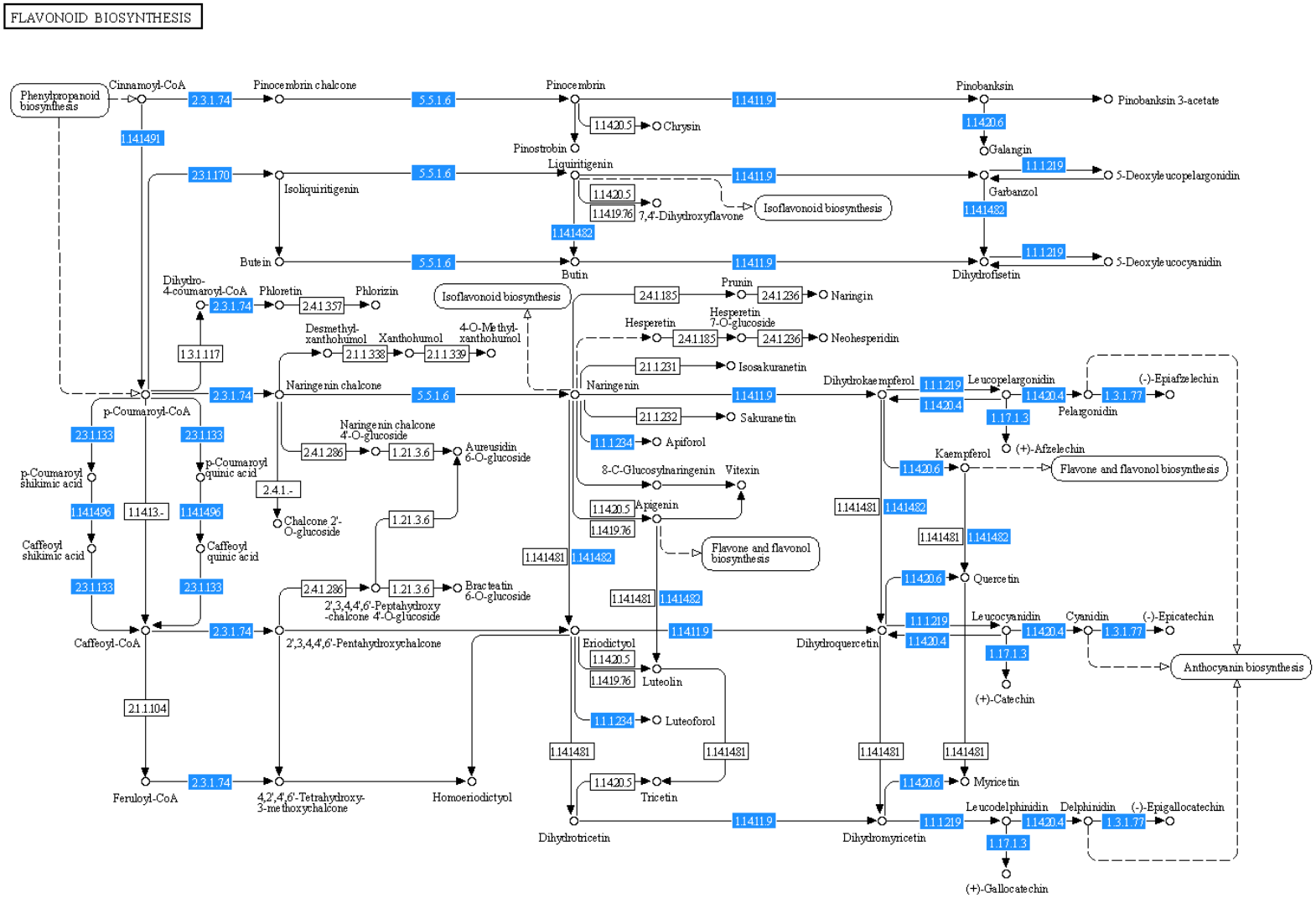

Figure 52 : **Gènes différentiellement exprimés à l'obscurité par rapport à t0 impliqués dans le métabolisme des flavonoïdes** (Bleu: sous-exprimés, Rouge : surexprimés).

al. (2020). Enfin pour le gène *DHAR1*, qui fait partie du métabolisme du glutathion, est réprimé à l'obscurité (environ deux fois moins), ce qui confirme le résultat obtenu par Porcher et al. (2020).

Parmi les 64 gènes étudiés par l'équipe, 27 gènes ont une expression cohérente avec ce qui a été montré par l'équipe, 18 gènes qui ont une expression opposée à ce qui a été déjà été étudié et 19 gènes dont la comparaison avec les études précédentes n'est pas possible (étude portant sur l'apport exogène de sucres ou hormones, temps d'étude après décapitation plus tardif etc…).

3. Discussion et conclusion

Ce chapitre avait pour but d'étudier l'évolution du transcriptome du bourgeon axillaire de rosier, 6 heures après décapitation soumis à un traitement lumière ou obscurité (t6L et t6D, respectivement) par rapport au moment de la décapitation (t0).

Dans un premier temps, nous avons pu observer qu'environ 3700 gènes sont différentiellement exprimés à la lumière et 5700 à l'obscurité, il semble y avoir une forte régulation de réseaux de gènes à l'obscurité. Cela pourrait potentiellement s'expliquer que les plantes subissent un changement brutal de la condition lumineuse à l'obscurité, en décalage avec le rythme circadien.

Puis dans un deuxième temps, l'enrichissement des voies métaboliques nous a permis de montrer que des voies métaboliques déjà caractérisées dans le contrôle du débourrement qui jouent un rôle dans les phases précoces (6 heures après décapitation) comme la transduction du signal hormonal, métabolisme des sucres et métabolisme des ROS sont photo-régulées. Par ailleurs, nous avons identifié des changements d'expression suggérant que de nouveaux mécanismes peu étudiés encore comme le métabolisme des lipides, le métabolisme des flavonoïdes et celui de certains acides aminés pour être impliqués dans les phases précoces du débourrement. De même, nous avons pu mettre en avant un nouveau potentiel intégrateur qui pourrait avoir un rôle général dans le contrôle du débourrement. En effet, le gène *HY5* est réprimé en réponse à la décapitation. Cette protéine est capable d'interagir avec d'autres gènes et protéines impliquées dans les voies des acteurs connus dans le contrôle du débourrement : l'auxine, les cytokinines, l'ABA, les brassinostéroïdes, les GA et les sucres. Ce gène est donc très intéressant et son implication dans le contrôle du débourrement pourrait être approfondi.

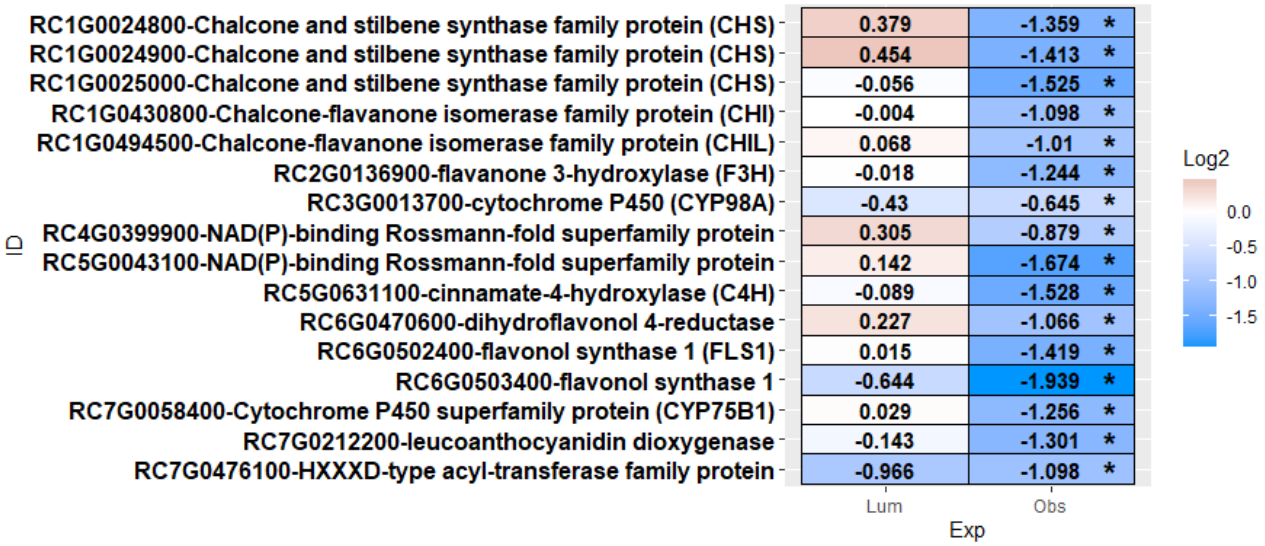

Figure 53 : **Evolution de l'expression des gènes différentiellement exprimés à l'obscurité, associés à la biosynthèse des flavonoïdes, au cours des phénomènes précoces du débourrement après décapitation.** Comparaison de l'expression en Log2 Fold Change des gènes dans le bourgeon de rosier, 6 heures après décapitation à la lumière ou à l'obscurité (Bleu : gène sous-exprimé, Rouge : gène surexprimé). Les astérisques représentent les différences significatives (p.adj≤0.05).

Nous montrons dans notre séquençage que des gènes impliqués dans la voie de signalisation des BR sont réprimés à la lumière et induits à l'obscurité. Cependant, il existe peu de données sur l'implication des BR dans le contrôle du débourrement. Il a été montré que chez le riz les BR ont un rôle promoteur du débourrement (Fang et al., 2020).

Néanmoins, il a été montré également que les BR pourraient interagir avec les SL (Wang et al., 2013). En conclusion, nous pouvons émettre l'hypothèse que les brassinostéroïdes auraient un rôle différent chez le rosier.

De plus, il a également été montré par Corot et al., (2017) que l'ABA a un rôle inhibiteur du débourrement chez le rosier, nous montrons dans notre séquençage que des *ABA RESPONSE FACTORS* (*ABFs*) sont surexprimés à la lumière et réprimés à l'obscurité ce qui n'est pas en accord avec cette étude précédente montrant l'effet inhibiteur de l'ABA sur le débourrement car les ABFs sont des régulateurs positifs de la signalisation ABA. Cependant, le rôle des ABF n'a pas encore été établi dans le contrôle du débourrement et une étude plus poussée est nécessaire afin de comprendre un peu mieux le rôle de l'ABA dans le contrôle du débourrement chez le rosier.

Et enfin dans un troisième temps, nous avons pu valider dans nos conditions l'expression de 27 gènes parmi les 64 gènes déjà caractérisés par l'équipe comme ayant un rôle dans le contrôle du débourrement dans notre séquençage, dont notamment la *RhNAD-SDH* qui est induite à l'obscurité et marqueur de l'activation de la voie du sorbitol à l'obscurité.

Nous proposons un modèle de réseau de régulation en réponse à la décapitation ou sous photo-contrôle, dans les phases précoces du débourrement (Figure 55).

En conclusion, nous avons donc pu mettre en avant tout un réseau de régulation transcriptionnel impliquant différentes voies métaboliques et notamment des FTs. En particulier, nous avons pu observer qu'un certain nombre de FTs semblent être régulés par la lumière et impliqués dans divers processus de développement. Par exemple, nous avons pu voir que des *ARFs* (*AUXIN RESPONSE FACTOR*) sont réprimés à la lumière. Ces FTs sont impliqués dans la signalisation de l'auxine et certains peuvent être ciblés par des miARNs (Mallory et al., 2005). Par ailleurs, il a été décrit dans la littérature que les miARNs, chez les plantes comme chez les animaux, ciblent préférentiellement des facteurs de transcription (Rhoades et al., 2002). Ces miARNs pourraient donc avoir un rôle dans une régulation post-transcriptionnelle de facteurs de transcription (et autres gènes) qui seraient impliqués dans le contrôle du débourrement et que donc ces miARNs pourraient être régulateurs du débourrement. C'est ce que nous allons étudier dans les deux chapitres suivants par deux approches : une approche candidate basée sur la littérature et nos connaissances sur le réseau de régulation transcriptionnel du débourrement, puis par une approche *sans a priori* par l'analyse d'expression des petits ARNs dans le séquençage des petits ARNs.

Tableau V : **Principaux gènes impliqués dans le contrôle du débourrement et son photo-contrôle chez *Rosa***. Les numéros d'accession correspondant des homologues *Rosa chinensis* et des orthologues *Arabidopsis thaliana* sont indiqués.

Processus biologique	**Fonction**	**Gènes *Rosa* sp. décrits dans le contrôle du débourrement (Rh pour *Rosa* 'Radrazz' ; Rw pour *Rosa x wichurana*)**	**Références**	**Numéro d'accession des homologues de *Rosa chinensis* (Hibrand-Saint Oyant et al., 2018)**	**Numéro d'accession des orthologues *Arabidopsis thaliana* (version TAIR 10)**
Hormone - Auxine	Biosynthèse	*RhYUCCA1*	Barbier et al., 2015	RC0G0230100	AT4G32540
		RhTAR1	Barbier et al., 2015	RC7G0149400	AT1G23320
	Transport	*RhPIN1*	Barbier et al., 2015	RC7G0016500	AT1G73590
		RhPID	Barbier et al., 2015	RC5G0142700	AT2G34650
		RhPP2A	Barbier et al., 2015	RC4G0397100	AT1G69960
Hormone - CK	Biosynthèse	*RhIPT3*	Roman et al., 2016	RC6G0410100	AT3G63110
		RhIPT5	Roman et al., 2016	RC4G0245000	AT5G19040
	Activation	*RhLOG3*	Roman et al., 2016	RC6G0304400	AT2G37210
		RhLOG8	Roman et al., 2016	RC6G0591500	AT5G11950
	Signalisation	*RhARR3*	Roman et al., 2016	RC4G0477500	AT1G59940
		RhARR5	Roman et al., 2016	RC7G0031400	AT3G48100
	Transport	*RhENT1*	Roman et al., 2016	RC4G0469600	AT1G70330
		RhPUP5	Roman et al., 2016	RC2G0013600	AT2G24220
	Dégradation	*RhCKX1*	Roman et al., 2016	RC3G0106400	AT2G41510
		RhCKX6	Roman et al., 2016	RC1G0050300	AT3G63440
Hormone-SL	Biosynthèse	*RwMAX1*	Djennane et al., 2014	RC6G0591100	AT2G26170
		RwMAX3	Djennane et al., 2014	RC1G0278600	AT2G44990
		RwMAX4	Djennane et al., 2014	RC6G0548900	AT4G32810
	Signalisation	*RwMAX2*	Djennane et al., 2014	RC2G0386000	AT2G42620
Hormone - GA	Biosynthèse	*RhGA20ox*	Choubane et al., 2012	RC1G0530300	AT4G25420
		RhGA2ox	Choubane et al., 2012	RC5G0246800	AT1G78440
		RhGA3ox	Choubane et al., 2012	RC2G0451600	AT1G15550
Cycle cellulaire	Division cellulaire	*RhCYCD3;1*	Roman et al., 2016	RC2G0200400	AT4G34160
		RhPCNA1	Roman et al., 2016	RC5G0585000	AT1G07370
	Expansion de la paroi cellulaire	*RhEXPA1*	Roman et al., 2017	RC5G0626300	AT2G40610
		RhEXPA2	Roman et al., 2017	RC3G0260200	AT2G39700
		RhEXPA3	Roman et al., 2016 Roman et al., 2017	RC2G0618000	AT1G69530
Sucres	Métabolisme des sucres	*RhSUSY1*	Roman et al., 2016	RC2G0105700	AT5G20830
		RhNAD-SDH	Girault et al., 2010 Roman et al., 2016	RC1G0532900	AT5G51970
		RhVI1	Girault et al., 2010	RC1G0516400	AT1G62660
		RhVI2	Rabot et al., 2012	RC7G0234000	AT1G12240
		Rh6PFK	Wang et al., 2021	RC7G0357900	AT1G20950
		RhPK	Wang et al., 2021	RC1G0556400	AT5G52920
		RhMD	Wang et al., 2021	RC7G0239300	AT4G17260

Processus biologique	Fonction	Gènes *Rosa* sp. décrits dans le contrôle du débourrement (Rh pour *Rosa* 'Radrazz' ; Rw pour *Rosa x wichurana*)	Références	Numéro d'accession des homologues de *Rosa chinensis* (Hibrand-Saint Oyant et al., 2018)	Numéro d'accession des orthologues *Arabidopsis thaliana* (version TAIR 10)
Sucres	Métabolisme des sucres	*Rh6PD*	Wang et al., 2021	RC4G0422200	AT3G29360
		RhG6PD	Wang et al., 2021	RC0G0007400	AT5G13110
		Rh2OD	Wang et al., 2021	RC5G0355100	AT4G26910
		RhHXK1	Wang et al., 2021	RC2G0068400	AT4G29130
	Transport	*RhSUC1*	Henry et al., 2011	RC6G0482600	AT1G71880
		RhSUC2	Henry et al., 2011	RC6G0239200	AT1G22710
		RhSUC3	Henry et al., 2011	RC4G0436300	AT2G02860
		RhSUC4	Henry et al., 2011	RC7G0494700	AT1G09960
		RhSWEET10	Roman et al., 2016	RC7G0116000	AT5G50790
		RhSTP1	Wang et al., 2021	RC5G0057200	AT1G11260
ROS	Homéostasie redox cellulaire	*RhGR1*	Porcher et al., 2020 Porcher et al.,2021	RC0G0077700	AT3G24170
		RhGR2	Porcher et al., 2020 Porcher et al.,2021	RC6G0391800	AT3G54660
	Détoxification	*RhAPX1*	Porcher et al., 2020	RC5G0530600	AT1G07890
		RhAPX6	Porcher et al., 2020 Porcher et al.,2021	RC6G0464200	AT4G32320
		RhCAT	Porcher et al., 2020 Porcher et al.,2021	RC7G0342400	AT4G35090
	Synthèse du glutathion	*RhGSH1*	Porcher et al., 2020 Porcher et al.,2021	RC7G0192300	AT4G23100
	Synthèse du glutathion	*RhGSH2*	Porcher et al., 2020 Porcher et al.,2021	RC3G0364000	AT5G27380
	Homologues des Respiratory Burst Oxidase	*RhRBOHB1*	Porcher et al., 2021	RC3G0349300	AT1G09090
		RhRBOHB2	Porcher et al., 2021	RC3G0349100	AT1G09090
		RhRBOHD	Porcher et al., 2021	RC4G0330300	AT5G47910
		RhRBOHD2	Porcher et al., 2021	RC7G0236200	AT5G47910
		RhRBOHD3	Porcher et al., 2021	RC7G0106000	AT5G47910
		RhRBOHF	Porcher et al., 2021	RC7G0180700	AT1G64060
		RhRBOHE1	Porcher et al., 2021	RC2G0105100	AT1G19230
		RhRBOHE2	Porcher et al., 2021	RC2G0174800	AT1G19230
		RhRBOHE3	Porcher et al., 2021	RC7G0059800	AT1G19230
		RhRBOHHJ	Porcher et al., 2021	RC5G0534300	AT5G60010
	Acide monodéhydroascorbique réductase	*RhMDHAR6*	Porcher et al., 2021	RC7G0183000	AT1G63940
	Processus métabolique du glutathion	*RhDHAR1*	Porcher et al., 2021	RC1G0433100	AT1G75270
	Intégrateur	*RhBRC1*	Barbier et al., 2015 Roman et al., 2016	RC7G0073800	AT3G18550
Métabolisme des acides aminés	Synthèse d'asparagine	*RhASN1*	Wang et al., 2021	RC5G0605600	AT3G47340

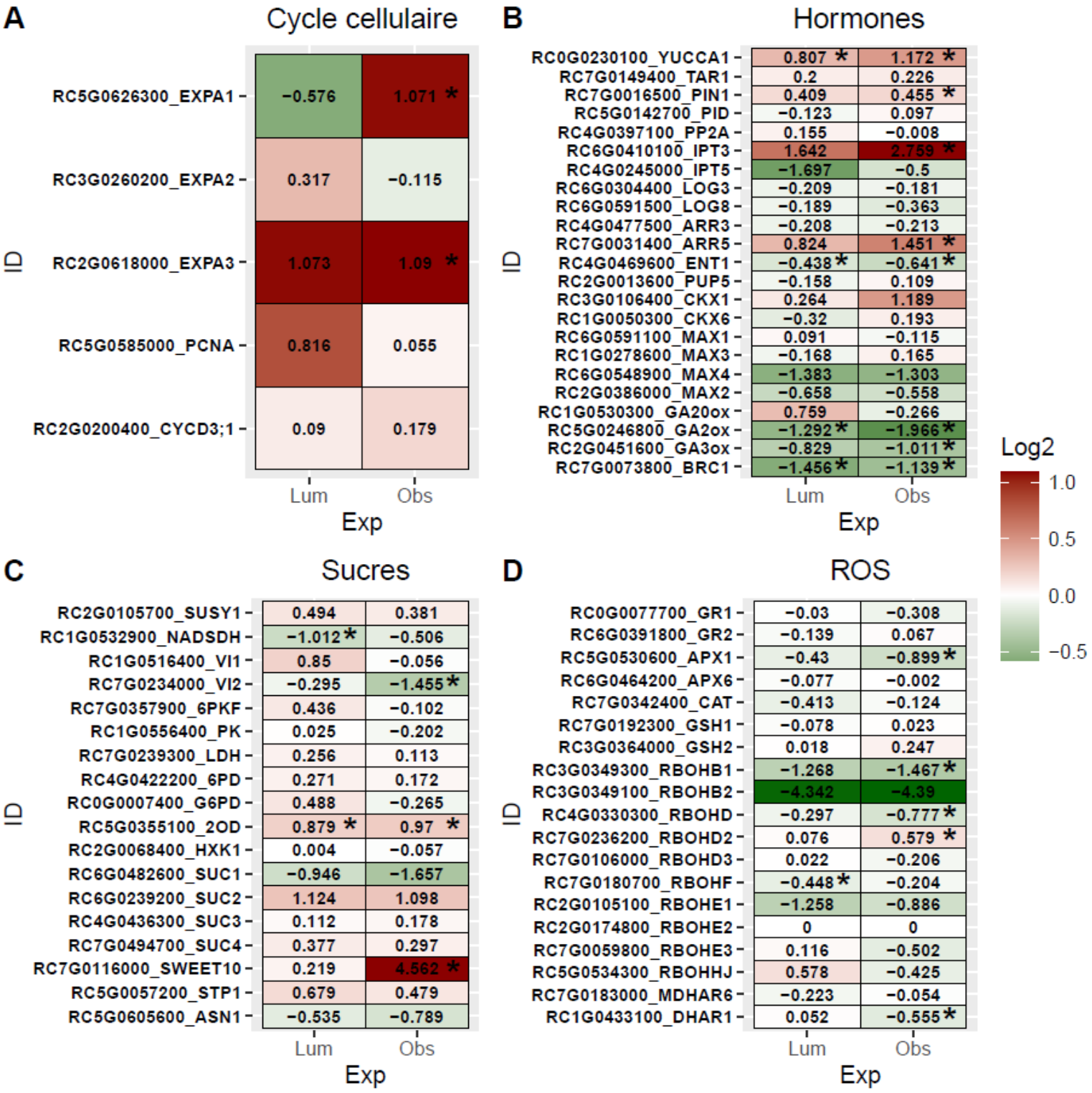

Figure 54 : **Evolution de l'expression des gènes différentiellement exprimés à la lumière caractérisés dans le contrôle du débourrement chez le Rosier, au cours des phénomènes précoces du débourrement après décapitation.** Comparaison de l'expression en Log2 Fold Change des gènes dans le bourgeon de rosier, 6 heures après décapitation à la lumière ou à l'obscurité (Vert : gène sous-exprimé, Rouge : gène surexprimé). Les astérisques représentent les différences significatives (p.adj≤0.05)

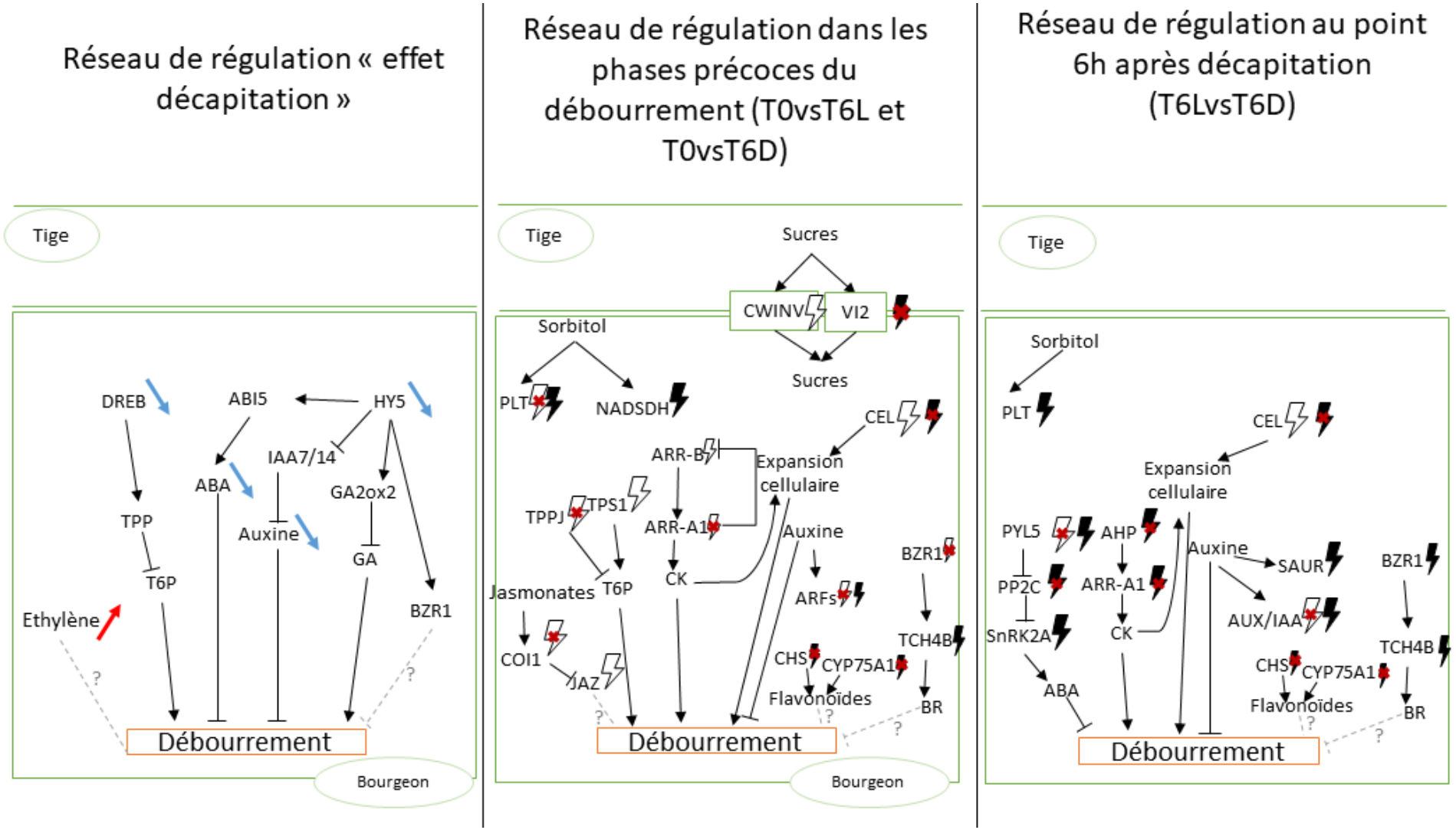

Figure 55 : **Bilan des différents acteurs différentiellement exprimés 6 heures après décapitation à la lumière ou à l'obscurité dans le bourgeon selon nos résultats de séquençage.** (Flèche Bleue : répression, Flèche rouge : induction, Eclair blanc : induction par la lumière, Eclair noir : induction à l'obscurité, croix rouge : répression). Les flèches pleines représentent une induction, les barres représentent une répression et les barres en pointillé représentent le rôle potentiel dans le contrôle du débourrement qui reste à élucider.

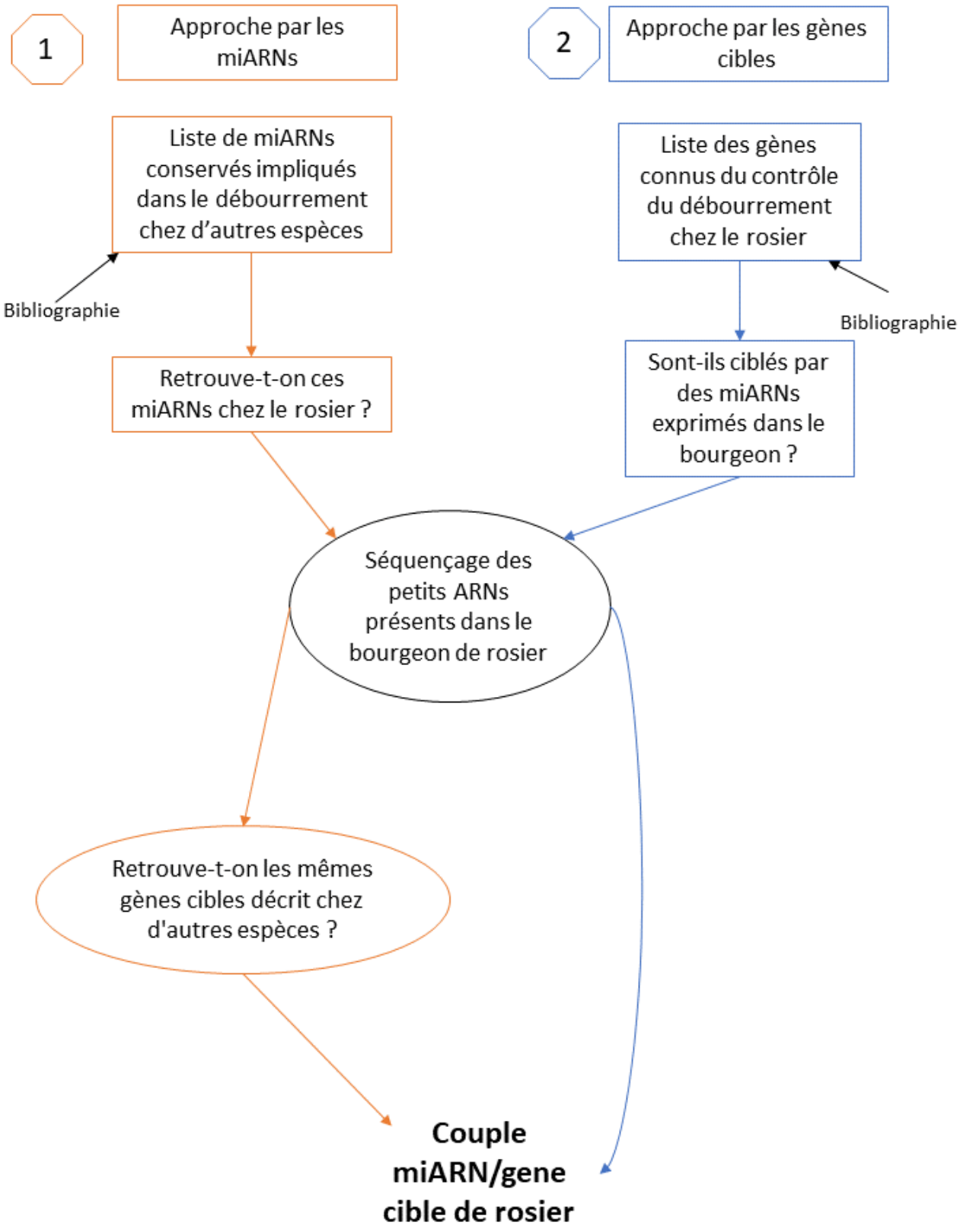

Figure 56 : **Synthèse de la démarche suivie dans le chapitre 2.**

Chapitre II : Recherche *in silico* par approche candidate de couples miARN/gène cible impliqués dans le contrôle du débourrement chez le rosier

Comme mentionné en introduction, un grand nombre d'informations ont été acquises concernant les régulations transcriptionnelles du débourrement aussi bien chez les monocotylédones que chez les dicotylédones. A l'inverse, à ce jour, peu d'études font état du rôle des miARNs, régulateurs post-transcriptionnels, dans ce processus. Nous utilisons ici l'avantage du modèle rosier pour explorer quels composants du réseau de régulation du débourrement déjà établi par l'équipe pourraient être cibles d'une régulation post-transcriptionnelle par les miARNs.

Ce chapitre s'articule autour de deux principales questions: (i) Quels miARNs, déjà décrits dans la littérature pour leur rôle dans le contrôle du débourrement chez d'autres espèces, sont également exprimés dans le bourgeon de rosier? (Figure 56-1) (ii) Quels gènes du réseau de régulation déjà établi du contrôle du débourrement chez le bourgeon de rosier *Rosa* 'Radrazz' sont ciblés par ces miARNs (Figure 56-2).

1. Etude des miARNs conservés chez le rosier

Afin de répondre à ces questions et appréhender le rôle potentiel des miARNs dans le contrôle du débourrement, les petits ARNs (miARNs et siARNs) de bourgeons axillaires du rosier *Rosa* 'Radrazz' ont été séquencés. Dans une première démarche, nous avons pu ainsi analyser si les miARNs préalablement décrits comme jouant un rôle dans la modulation de la ramification chez des espèces autres que le rosier (Tableau I, introduction) sont exprimés dans le bourgeon axillaire de rosier. Dans l'affirmative, les miARNs identifiés seront nommés "miARNs conservés" pour la suite du document. Puis, dans un second temps, la capacité de ces miARNs conservés à s'hybrider aux gènes cibles communément décrits dans la littérature chez d'autres espèces a été étudiée.

Afin de lever la dominance apicale et induire le débourrement, l'apex des tiges ont été décapitées puis les plantes ont été cultivées à la lumière. Nous avons collecté les bourgeons immédiatement et 6 heures après décapitation. A ce temps de 6h, les mécanismes moléculaires clés du processus de débourrement et du photo-contrôle prennent place (Barbier et al., 2015 ; Roman et al., 2016 ; Porcher et al., 2020 ; Porcher et al., 2021). Cette fenêtre temporelle a également été choisie afin d'éviter les boucles de rétroaction pouvant exister entre des miARNs et le produit de leurs gènes cibles.

Il a été par exemple montré que les miR160 et 167 peuvent réguler des ARFs (AUXIN RESPONSE FACTORS) et que les promoteurs ou régions promotrices de miARNs présentent des sites de fixation de ces mêmes ARFs induisant ainsi une boucle de rétrocontrôle (Gutierrez et al., 2009).

Le séquençage des petits ARNs a été réalisé sur les mêmes échantillons d'ARN totaux que ceux utilisés pour le séquençage des ARNm présentés dans le Chapitre I. Afin d'identifier parmi les petits ARNs ceux correspondants aux miARNs matures, une recherche de structures secondaires dans la séquence de leurs précurseurs potentiels (structure tige-boucle) a été réalisée. L'annotation des miARNs matures de *Rosa* a ensuite été obtenue à l'aide de la base de données miRBase (http://www.mirbase.org/index.shtml). Les séquences annotées des miARNs matures de *Rosa* 'Radrazz' sont disponibles en Annexe 6.

Afin d'identifier les gènes cibles de miARNs, ces séquences ont ensuite été alignées contre les orthologues des gènes décrits comme leurs cibles principales dans la littérature et présents dans le génome de *Rosa chinensis* à l'aide de l'outil de prédiction de gènes cibles PsRNA Target (Dai X et al., 2018 ; https://www.zhaolab.org/psRNATarget/). Les cibles prédites présentant un score ≤ 3,5 ont été retenues.

Cela nous a permis d'une part, d'obtenir un instantané du profil d'accumulation des miARNs présents dans le bourgeon axillaire de rosier juste après levée de dominance apicale à un temps précoce du débourrement. D'autre part, cette analyse nous a permis de prédire la potentialité de ces miARNs à reconnaître chez *Rosa* 'Radrazz' les gènes cibles connus et décrits dans la littérature chez des espèces autres que le rosier (Tableau VI).

Notre analyse bio-informatique montre que 7 des 9 familles de miARNs précédemment décrites chez d'autres plantes modèles comme impliquées dans le contrôle du débourrement (Tableau I en introduction ; miR156, miR164, miR171, miR172 miR319, miR393, miR397, miR444 et miR529), sont exprimées dans les bourgeons de rosiers dans au moins une condition (Tableau VI). Ces résultats suggèrent que les régulations impliquant ces familles de miARNs et leurs cibles pourraient être conservées chez *Rosa* 'Radrazz'.

Les deux familles de miARNs dont nous ne détectons pas l'expression dans aucune de nos conditions (i.e. miR444 et miR529), sont également absentes chez d'autres espèces dicotylédones (Sunkar et Jagadeeswaran, 2008). Ce résultat vient renforcer l'hypothèse que le miR529 a été perdu chez les dicotylédones au cours de l'évolution et que le miR444 est restreint aux monocotylédones (Sunkar et al., 2005 ; Morea et al., 2016).

Tableau VI : **MiARNs conservés exprimés dans le bourgeon de *Rosa* 'Radrazz' et leurs gènes cibles prédits.** Les miARNs matures de *Rosa* 'Radrazz' conservés ont été identifiés à partir du séquençage haut-débit des petits ARNs de bourgeons axillaires n°3 juste après décapitation de la tige de plantes exposées à la lumière et 6 heures après décapitation. La prédiction de gènes cibles a été réalisée à l'aide de l'outil psRNATarget (Dai X. et al., 2018 ; https://www.zhaolab.org/psRNATarget/) en utilisant un score de prévision ≤ 3.5 afin d'éviter des résultats faux-positifs. Pour les gènes cibles, les numéros d'accession correspondants des homologues *Rosa chinensis* et des orthologues d'*Arabidopsis thaliana* sont indiqués.

Familles miARNs conservées	Nombre total de membres de la famille des miARN identifiés dans les bourgeons de *Rosa* 'Radrazz' et noms de ceux présentant une capacité de liaison à une cible connue identifiée dans d'autres espèces végétales	Nombre total de membre de la famille miARN chez *Arabidopsis thaliana*	Gènes cibles identifiés dans le génome de *Rosa chinensis* avec un score de prévision ≤ 3,5	Numéro d'accession des homologues de *Rosa chinensis* (Hibrand-Saint Oyant et al., 2018)	Numéro d'accession des orthologues d'*Arabidopsis thaliana* (version TAIR 10)
156	14 miR156c / miR156f / miR156c_1 / miR156k_1/ miR156a /miR156a-5p/ miR156j_1 / miR156k_2/ miR156_2 /miR156g_1	10	*SPL2* *SPL3* *SPL6A* *SPL6B* *SPL6C* *SPL9* *SPL10* *SPL13A* *SPL16A* *SPL16B*	RC4G0346800 RC5G0081600 RC4G0415800 RC7G0063500 RC7G0063900 RC3G0139500 RC1G0282700 RC7G0120000 RC2G0684700 RC4G0344900	AT5G43270 AT2G33810 AT1G69170 AT1G69170 AT1G69170 AT2G42200 AT1G27370 AT5G50570 Pas SPL16 chez Arabidopsis
164	7 miR164a_2 / miR164a_4 / miR164b / 164e-5p / miR164f_1	3	*NAC1* *NAC100_1* *NAC100_2* *NAC100_3* *CUC2*	RC5G0238100 RC7G0049200 RC7G0049800 RC2G0616000 RC0G0187100	AT1G56010 AT5G61430 AT5G61430 AT5G61430 AT5G53950
171	19 miR171b / miR171b-3p / miR171b-3p_3 / miR171f-3p / miR171a-3p/ miR171a-3p_1 / miR171a_3 / miR171b_2/ miR171b_3 / miR171_2 / miR171c_3 / miR171d_1/ miR171f_3	3	*SCL6* *SCL6*	RC1G0287300 RC7G0240100	AT4G00150 AT4G00150
172	17 miR172a_4 / miR172i / miR172a_2 / miR172a_3/ miR172c-3p /miR172d_2/ miR172e-3p_1 / miR172a_1 / miR172b / miR172e-3p / miR172g-3p / miR172f	5	*RAP 2.7/TOE 1* *RAP 2.7/TOE 1* *AP2* *TOE3*	RC1G0423500 RC5G0530900 RC2G0197000 RC3G0243000	AT2G28550 AT2G28550 AT4G36920 AT5G67180
319	11 miR319_1 / miR319a_1 / miR319a-3p / miR319c_1/ miR319f_1 / miR319g / miR319a / miR319b_1 / miR319c_2	3	*TCP2* *TCP4*	RC5G0134300 RC5G0279600	AT4G18390 AT3G15030
393	8 miR393a_1 / miR393a_3/ miR393-5p / miR393a / miR393a-5p / miR393b-5p / miR393h	2	*AFB2* *TIR1*	RC2G0688700 RC6G0421400	AT3G26810 AT3G62980
397	3 miR397-5p_1 / miR397a_6 / miR397a_3	2	*LAC2* *LAC3* *LAC4A* *LAC4B* *LAC7A* *LAC7B* *LAC11A* *LAC11B* *LAC11C* *LAC11D* *LAC11E* *LAC11F* *LAC17A* *LAC17B* *LAC17C*	RC5G0566900 RC5G0617100 RC3G0283200 RC5G0590200 RC3G0278900 RC5G0655700 RC6G0173800 RC6G0174100 RC6G0176400 RC6G0176600 RC6G0177800 RC6G0181300 RC3G0261900 RC3G0262200 RC5G0533800	AT2G29130 AT2G30210 AT2G38080 AT2G38080 AT3G09220 AT3G09220 AT5G03260 AT5G03260 AT5G03260 AT5G03260 AT5G03260 AT5G03260 AT5G60020 AT5G60020 AT5G60020

Chaque famille de miARNs de rosier identifiée est représentée par un nombre de membres variable selon les familles (*i.e*., 14 membres pour la famille miR156 ; 7 membres pour la famille miR164, Tableau VI). Les membres d'une même famille de miARNs diffèrent d'un ou deux nucléotides au niveau de leur séquence. Nous pouvons remarquer que le plus grand nombre de membres de miARN appartiennent à la famille miR171 (19 membres) suivie de miR172 (17 membres). A l'inverse, la famille miR397 est celle qui comporte le plus faible nombre de membres (3 membres). Par ailleurs, comparativement à l'espèce modèle *A. thaliana,* nous pouvons noter que le nombre de membres pour chaque famille de miARNs identifiés chez le rosier est plus élevé. Il n'est pas si étonnant de trouver des différences dans le nombre de membres dans une famille de miARNs entre deux espèces. En effet, il a été montré qu'il y a plus de membres par familles de miARNs chez le maïs par rapport au riz (environ 11 membres par famille chez le maïs contre deux membres par famille chez le riz en moyenne) (Xu et al., 2017).

La capacité de ces miARNs de *Rosa* à lier les cibles connues a été prédite par recherche de complémentarité de séquences avec les cibles putatives. Pour les 7 familles étudiées, nous retrouvons les mêmes gènes cibles décrits dans la littérature chez d'autres espèces. En effet, nous pouvons observer par exemple que le miR156 chez le rosier peut cibler 10 gènes appartenant à la famille des *SPLs* (*SPL2, SPL3, SPL6A, SPL6B, SPL6C, SPL9, SPL10, SPL13A, SPL16A, SPL16B*) alors que chez *Arabidopsis*, également 10 gènes *SPLs* peuvent être ciblés (*SPL3/SPL4/SPL5*, *SPL9/SPL15*, *SPL2/SPL10/SPL11*, *SPL6 et SPL13A/B*) (Xu et al., 2016). Cela est également le cas pour les autres familles (miR164 ciblant des gènes *NAC* et *CUC*, miR171/*SCL6*, miR172/*AP2*, miR319/*TCP*, miR393/*AFB* et *TIR1*, miR397/*LAC,* …). Ces résultats suggèrent que les régulations impliquant ces familles de miARNs et leurs cibles associées peuvent également être conservées dans les bourgeons axillaires de *Rosa* témoignant d'une conservation des processus de régulation au sein des végétaux. Ces différents modules confirmés dans le bourgeon laissent présager qu'ils joueraient un rôle dans le bourgeon axillaire et apportent de nouvelles pistes d'investigation dans le contrôle du débourrement.

Les résultats de cette analyse sont résumés en orange dans le schéma présenté en Figure 57 représentant le réseau de régulation des acteurs principaux du contrôle du débourrement chez le bourgeon de rosier *Rosa* 'Radrazz' implémenté du rôle potentiel des différents couples miARNs/gènes cibles que nous avons identifiés.

Cette figure met en évidence que pour une majorité des gènes impliqués dans le contrôle du débourrement (i.e.: *PUP*, *LOG*, *CKX*, *SWEET*), il n'est fait état d'aucune régulation par des miARNs dans la littérature à ce jour. Afin d'explorer si ce type de régulation existe chez le rosier et identifier ainsi de nouveaux couples miARNs/gènes cibles impliqués dans le contrôle du débourrement, nous avons examiné la capacité des miARNs matures identifiés dans le bourgeon de rosier à cibler ces mêmes gènes.

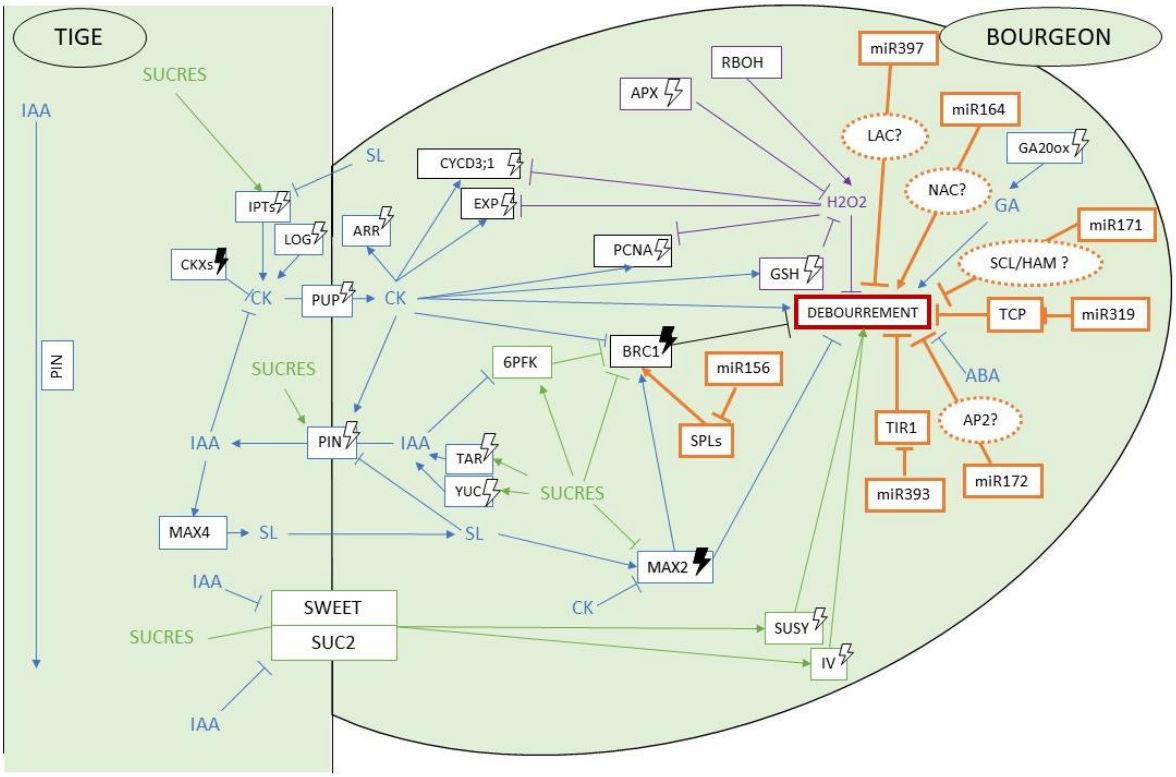

Figure 57 : **Réseau de régulations du débourrement chez le rosier *Rosa* 'Radrazz'* incluant les couples miARNs/gènes cibles conservés identifiés dans les bourgeons de rosier.** Les potentiels gènes cibles de ces miARNs dans le contrôle du débourrement sont représentés en ellipses orange en pointillés. Les miARNs impliqués dans le contrôle du débourrement selon la littérature ** et identifiés dans le séquençage des petits ARNs sont représentés en orange. Les flèches représentent une induction, les lignes droites représentent une répression, les éclairs blancs représentent une induction par la lumière, les éclairs noirs représentent une induction par l'obscurité. *Girault et al., 2008 ; Girault et al., 2010 ; Henry et al., 2011 ; Choubane et al., 2012 ; Rabot et al., 2012 ; Rabot et al., 2014 ; Djennane et al., 2014 ; Barbier et al., 2015 ; Roman et al., 2016 ; Roman et al., 2017 ; Porcher et al., 2020 ; Porcher et al., 2021 ; Wang et al., 2021a **Jiao et al., 2010 ; Miura et al., 2010 ; Wang et al., 2010 ; Wei et al., 2012 ; Xia et al., 2012 ; Curaba et al., 2013 ; Zhou et al., 2013 ; Zhang et al., 2013 ; Aung et al., 2014 ; Wang et al., 2015a ; Wang et al., 2015b ; Huang et al., 2017 ; Kravchik et al., 2019 ; Sun et al., 2019 ; Cui et al., 2020 ; Lian et al., 2021; Wang et al., 2021b ; Zhan et al., 2021.

2. Recherche de nouveaux couples miARN/gène cible dans le contrôle du débourrement chez le rosier

Afin d'identifier de nouveaux couples miARN/gène cible dans le contrôle du débourrement chez le rosier, une autre question qui se posait était de savoir si parmi les gènes du réseau de régulation déjà établi du contrôle du débourrement chez le bourgeon de rosier *Rosa* 'Radrazz' certains pouvaient être ciblés par les miARNs accumulés dans ce même bourgeon.

Pour répondre à cette question, les séquences nucléotidiques de l'ensemble des gènes de ce réseau ont été identifiées dans le génome de *Rosa chinensis* (Hibrand St-Oyant et al., 2018 ; Raymond et al., 2018) et ont été confrontées aux séquences des miARNs matures identifiées dans les bourgeons axillaires de *Rosa* 'Radrazz'. L'analyse a consisté à une recherche de complémentarité des séquences en utilisant l'outil de prédiction de gènes cibles PsRNA Target (Dai X. et al., 2018 ; https://zhaolab.org/psRNATarget/) (Tableau VII).

Notre analyse bio-informatique a révélé que parmi les 65 gènes liés au débourrement et à son photo-contrôle chez *Rosa*, seuls 9 gènes présentent un site de reconnaissance putatif à au moins un des miARNs matures exprimés dans le bourgeon (*CKX1/6*, *EXPA3*, *MAX4*, *CYCD3;1*, *SUSY*, *6PFK*, *APX1* et *RBOHB1*; Tableau VII). Tandis que la majorité de ces gènes sont reconnus par un unique membre d'une même famille de miARNs (*CKX1/6*, *EXPA3*, *CYCD3;1*, *SUSY*, *6PFK*, et *RBOHB1),* deux gènes, *APX1* et *MAX4* sont reconnus par 3 et 6 membres d'une même famille respectivement. Au total, les 15 miARNs matures appartiennent à 7 familles différentes de miARNs décrites chez d'autres végétaux (miR156, miR159, miR164, miR166, miR399, miR477 et miR8175; Figure 58, cadres bleus). Il est intéressant de noter que, parmi ces 7 familles, seules les familles miR156 et miR164 ont été décrites précédemment dans le contrôle du débourrement chez d'autres espèces (Tableau I). Ainsi, cette analyse nous a permis de mettre en évidence cinq nouvelles familles de miARNs qui s'avèrent potentiellement impliquées dans le débourrement.

A ce jour, les données bibliographiques rapportent une implication de ces cinq familles de miARNs (miR159, miR166, miR399, miR477 et miR8175) dans diverses autres fonctions que le débourrement.

Ainsi, miR159 dont l'expression est induite par l'ABA, participe au contrôle de la sensibilité à l'ABA des graines en réprimant l'expression des gènes *MYB101* et *MYB33* chez *Arabidopsis* (Reyes et Chua, 2007). MiR159 réprime l'expression de *MYB33*, l'empêchant ainsi d'induire l'expression du *MiR156* tout au long du développement des plantes pour assurer une temporalité correcte de la transition du stade végétatif juvénile-adulte chez *Arabidopsis* (Guo et al., 2017).

Tableau VII : **Principaux gènes impliqués dans le contrôle du débourrement et son photo-contrôle chez *Rosa* et leurs miARNs associés prédits après analyse psRNATarget**. Les numéros d'accession correspondant des homologues de *Rosa chinensis* et orthologues d'*Arabidopsis thaliana* sont indiqués. La régulation par la lumière de ces gènes dans le bourgeon rapporté dans la littérature sont mentionnés comme (a) Gènes induits par la lumière, (b) Gènes réprimés par la lumière, (c) Gènes induits par l'obscurité et (d) Gènes réprimés par l'obscurité.

Processus métabolique	**Fonction**	**Gènes *Rosa* sp. décrits dans le contrôle du débourrement (Rh pour *Rosa* 'Radrazz' ; Rw pour *Rosa x wichurana*)**	**Régulation par la lumière**	**Références**	**Numéro d'accession des homologues de *Rosa chinensis* (Hibrand-Saint Oyant et al., 2018)**	**Numéro d'accession des orthologues *Arabidopsis thaliana* (version TAIR 10)**	**Gènes identifiés comme cibles dans le génome de *Rosa chinensis* avec un score de prévision ≤ 3,5**
Hormone - Auxine	Biosynthèse	*RhYUCCA1*	a,d	Barbier et al., 2015 Roman et al., 2016a, d	RC0G0230100	AT4G32540	non ciblé
		RhTAR1	a	Barbier et al., 2015 Roman et al., 2016a	RC7G0149400	AT1G23320	non ciblé
	Transport	*RhPIN1*		Barbier et al., 2015	RC7G0016500	AT1G73590	non ciblé
		RhPID		Barbier et al., 2015	RC5G0142700	AT2G34650	non ciblé
		RhPP2A		Barbier et al., 2015	RC4G0397100	AT1G69960	non ciblé
Hormone - CK	Biosynthèse	*RhIPT3*	a	Barbier et al., 2015 Roman et al., 2016a	RC6G0410100	AT3G63110	non ciblé
		RhIPT5	a	Barbier et al., 2015 Roman et al., 2016c	RC4G0245000	AT5G19040	non ciblé
	Activation	*RhLOG3*	a	Roman et al., 2016a	RC6G0304400	AT2G37210	non ciblé
		RhLOG8	a	Roman et al., 2016a	RC6G0591500	AT5G11950	non ciblé
	Signalisation	*RhARR3*	a	Roman et al., 2016a	RC4G0477500	AT1G59940	non ciblé
		RhARR5	a	Roman et al., 2016 a	RC7G0031400	AT3G48100	non ciblé
	Transport	*RhENT1*	c	Roman et al., 2016 c	RC4G0469600	AT1G70330	non ciblé
		RhPUP5	a,d	Roman et al., 2016 a,d	RC2G0013600	AT2G24220	non ciblé
	Dégradation	***RhCKX1***	**b,c**	**Barbier et al., 2015 Roman et al., 2016 b,c**	**RC3G0106400**	**AT2G41510**	**miR 159a_1**
		RhCKX6	**b,c**	**Roman et al., 2016 b,c**	**RC1G0050300**	**AT3G63440**	**miR 159a_1**

Processus métabolique	**Fonction**	**Gènes *Rosa* sp. décrits dans le contrôle du débourrement (Rh pour *Rosa* 'Radrazz' ; Rw pour *Rosa x wichurana*)**	**Régulation par la lumière**	**Références**	**Numéro d'accession des homologues de *Rosa chinensis* (Hibrand-Saint Oyant et al., 2018)**	**Numéro d'accession des orthologues *Arabidopsis thaliana* (version TAIR 10)**	**Gènes identifiés comme cibles dans le génome de *Rosa chinensis* avec un score de prévision ≤ 3,5**
Hormone-SL	Biosynthèse	*RwMAX1*		Djenanne et al., 2014	RC6G0591100	AT2G26170	non ciblé
		RwMAX3		Djenanne et al., 2014 Barbier et al., 2015	RC1G0278600	AT2G44990	non ciblé
		RwMAX4		**Djenanne et al., 2014 Barbier et al., 2015**	**RC6G0548900**	**AT4G32810**	**miR166/a/a-3p/e-3p/h-3p/m_2**
	Signalisation	*RwMAX2*	c	Djenanne et al., 2014 c	RC2G0386000	AT2G42620	non ciblé
Hormone - GA	Biosynthèse	*RhGA20ox*	a	Choubane et al., 2012a	RC1G0530300	AT4G25420	non ciblé
		RhGA2ox	b,c	Choubane et al., 2012 b,c	RC5G0246800	AT1G78440	non ciblé
		RhGA3ox	a	Choubane et al., 2012a	RC2G0451600	AT1G15550	non ciblé
Cycle cellulaire	Division cellulaire	***RhCYCD3;1***	**a,d**	Roman et al., 2016 a,d	**RC2G0200400**	**AT4G34160**	**miR477e**
		RhPCNA1	a,d	Roman et al., 2016 a,d	RC5G0585000	AT1G07370	non ciblé
	Expansion de la paroi	*RhEXPA1*	a	Roman et al., 2017 a	RC5G0626300	AT2G40610	non ciblé
		RhEXPA2	a	Roman et al., 2017 a	RC3G0260200	AT2G39700	non ciblé
		RhEXPA3	**a,d**	**Roman et al., 2016 a,d Roman et al., 2017**	**RC2G0618000**	**AT1G69530**	**miR156j_1**
Sucres	Métabolisme du sucre	***RhSUSY1***	**a,d**	**Roman et al., 2016a, d**	**RC2G0105700**	**AT5G20830**	**miR8175**
		RhNAD-SDH	b,c	Girault et al., 2010b Roman et al., 2016 c	RC1G0532900	AT5G51970	non ciblé
		RhVI1	a,d	Girault et al., 2010a Roman et al., 2016 d	RC1G0516400	AT1G62660	non ciblé
		RhVI2	a	Rabot et al., 2012a	RC7G0234000	AT1G12240	non ciblé
		Rh6PFK		**Wang et al., 2021a**	**RC7G0357900**	**AT1G20950**	**miR166e-5p**
		RhPK		Wang et al., 2021a	RC1G0556400	AT5G52920	non ciblé

Processus métabolique	**Fonction**	**Gènes *Rosa* sp. décrits dans le contrôle du débourrement (Rh pour *Rosa* 'Radrazz' ; Rw pour *Rosa x wichurana*)**	**Régulation par la lumière**	**Références**	**Numéro d'accession des homologues de *Rosa chinensis* (Hibrand-Saint Oyant et al., 2018)**	**Numéro d'accession des orthologues *Arabidopsis thaliana* (version TAIR 10)**	**Gènes identifiés comme cibles dans le génome de *Rosa chinensis* avec un score de prévision ≤ 3,5**
Sucres	Métabolisme du sucre	*RhMD*		Wang et al., 2021a	RC7G0239300	AT4G17260	non ciblé
		Rh6PD		Wang et al., 2021a	RC4G0422200	AT3G29360	non ciblé
		RhG6PD		Wang et al., 2021a	RC0G0007400	AT5G13110	non ciblé
		Rh2OD		Wang et al., 2021a	RC5G0355100	AT4G26910	non ciblé
		RhHXK1		Wang et al., 2021a	RC2G0068400	AT4G29130	non ciblé
	Transport	*RhSUC1*		Henry et al., 2011	RC6G0482600	AT1G71880	non ciblé
		RhSUC2	a,d	Henry et al., 2011a	RC6G0239200	AT1G22710	non ciblé
		RhSUC3		Henry et al., 2011	RC4G0436300	AT2G02860	non ciblé
		RhSUC4		Henry et al., 2011	RC7G0494700	AT1G09960	non ciblé
		RhSWEET10	a	Roman et al., 2016 a	RC7G0116000	AT5G50790	non ciblé
		RhSTP1		Wang et al., 2021a	RC5G0057200	AT1G11260	non ciblé
ROS	Homéostasie redox	*RhGR1*	a,d	Porcher et al., 2020a Porcher et al.,2021 d	RC0G0077700	AT3G24170	non ciblé
		RhGR2	d	Porcher et al., 2020 Porcher et al.,2021 d	RC6G0391800	AT3G54660	non ciblé
	Détoxification	***RhAPX1***	**a**	**Porcher et al., 2020a**	**RC5G0530600**	**AT1G07890**	**miR164a_4 164b 164e-5p**
		RhAPX6	a,d	Porcher et al., 2020a Porcher et al.,2021 d	RC6G0464200	AT4G32320	non ciblé
		RhCAT	c	Porcher et al., 2020 Porcher et al.,2021 c	RC7G0342400	AT4G35090	non ciblé
	Biosynthèse du glutathion	*RhGSH1*	a,d	Porcher et al., 2020a Porcher et al.,2021 d	RC7G0192300	AT4G23100	non ciblé
		RhGSH2	a,d	Porcher et al., 2020a Porcher et al.,2021 d	RC3G0364000	AT5G27380	non ciblé

Processus métabolique	**Fonction**	**Gènes *Rosa* sp. décrits dans le contrôle du débourrement (Rh pour *Rosa* 'Radrazz' ; Rw pour *Rosa x wichurana*)**	**Régulation par la lumière**	**Références**	**Numéro d'accession des homologues de *Rosa chinensis* (Hibrand-Saint Oyant et al., 2018)**	**Numéro d'accession des orthologues *Arabidopsis thaliana* (version TAIR 10)**	**Gènes identifiés comme cibles dans le génome de *Rosa chinensis* avec un score de prévision ≤ 3,5**
ROS	Homologues des Respiratory Burst Oxidase	***RhRBOHB1***		**Porcher et al., 2021**	**RC3G0349300**	**AT1G09090**	**miR399e_5**
		RhRBOHB2		Porcher et al., 2021	RC3G0349100	AT1G09090	non ciblé
		RhRBOHD		Porcher et al., 2021d	RC4G0330300	AT5G47910	non ciblé
		RhRBOHD2		Porcher et al., 2021	RC7G0236200	AT5G47910	non ciblé
		RhRBOHD3		Porcher et al., 2021d	RC7G0106000	AT5G47910	non ciblé
		RhRBOHF	b	Porcher et al., 2021d	RC7G0180700	AT1G64060	non ciblé
		RhRBOHE1		Porcher et al., 2021	RC2G0105100	AT1G19230	non ciblé
		RhRBOHE2		Porcher et al., 2021	RC2G0174800	AT1G19230	non ciblé
		RhRBOHE3		Porcher et al., 2021	RC7G0059800	AT1G19230	non ciblé
		RhRBOHHJ		Porcher et al., 2021	RC5G0534300	AT5G60010	non ciblé
	Acide monodéhydroascorbique réductase	*RhMDHAR6*	a,d	Porcher et al., 2021a,d	RC7G0183000	AT1G63940	non ciblé
	Processus métabolique du glutathion	*RhDHAR1*	a,d	Porcher et al., 2021	RC1G0433100	AT1G75270	non ciblé
	Intégrateur	*RhBRC1*	c	Barbier et al., 2015 Roman et al., 2016 c	RC7G0073800	AT3G18550	non ciblé
Métabolisme des acides aminés	Synthèse d'asparagine	*RhASN1*		Wang et al., 2021	RC5G0605600	AT3G47340	non ciblé

Par analogie au contexte bourgeon, l'ABA, hormone inhibitrice du débourrement (Corot et al., 2017), peut induire l'expression du miR159, nous pouvons émettre l'hypothèse que ce miARN aurait un rôle inhibiteur du débourrement.

MiR166 cible les transcrits des facteurs de transcription HD-ZIP III qui jouent un rôle important dans l'établissement du méristème apical caulinaire (MAC) et dans la polarité des primordia foliaires (McConnell et al., 2001 ; Zhang et Zhang, 2012). Or, le débourrement des bourgeons de rosier s'accompagne de la néoformation de primordia foliaires (Girault et al., 2008). Le miR166 pourrait donc potentiellement jouer un rôle dans le développement des nouvelles feuilles lors du débourrement chez le rosier.

MiR399 a été étudié principalement pour son rôle dans la réponse à la carence en phosphate à travers la répression du gène *PHO2* (*PHOSPHATE 2*), un régulateur clé de l'homéostasie du phosphate (Baek et al., 2013 ; Tian et al., 2018). Lors d'une carence en phosphate, il a notamment été montré que la quantité de strigolactones (SL) augmente dans les racines de riz (Umehara et al., 2008). Par ailleurs, il a été montré que ces niveaux élevés de SL en réponse à cette carence contribuent à l'inhibition de la ramification chez le riz et chez le chrysanthème (Umehara et al., 2010 ; Xi et al., 2015). Même si cet effet de carence en phosphate sur le débourrement n'a pas encore été démontré chez le rosier, nous pouvons suggérer l'existence d'une interaction entre le miR399, les gènes de réponses à la carence en phosphate et les SL dans le contrôle du débourrement chez le rosier.

En ce qui concerne les deux derniers miARNs identifiés dans les bourgeons de rosier, miR477 et miR8175, peu de données sont disponibles à ce jour quant à leurs fonctions biologiques. MiR477 est décrit comme impliqué dans la maturation du fruit chez la vigne (Guo et al., 2018). Des études récentes rapportent par ailleurs un rôle de ce miARN dans l'immunité des plantes chez le théier (*Camellia sinensis*) contre *Verticillium dahlia* et chez le coton (*Gossypium hirsutum*) contre les infections de *Pseudopestalotiopsis* (Hu et al., 2020 ; Wang et al., 2020b).

Même si la fonction exacte du miR8175 n'est pas connue, il a été démontré que ce miARN est induit en réponse à une forte intensité lumineuse dans les racines d'*Arabidopsis thaliana* et au cours du dé-étiolement (Anna et al., 2019; Choi et al., 2020). Ses cibles précédemment notifiées dans la littérature sont variées. Il s'agit d'un gène codant une aquaporine-like chez l'orge (Wu et al., 2018), d'un gène codant une ABA-dependent kinase (Liu et El-Kassaby, 2017) ou encore un gène *GLYCEROL-3-PHOSPHATE SN-2-ACYLTRANSFERASE 4* chez *Arabidopsis* (Jatan et al., 2020). Ceci suggère que ce miARN conservé entre les espèces pourraient avoir des rôles multiples espèces-dépendant. Chez le rosier, une restriction en eau temporaire induit le débourrement comparativement à une condition confort (Demotes-Mainard et al., 2013).

Une hypothèse que nous pouvons proposer serait que ce miARN joue un rôle dans le flux d'eau au sein de la plante en lien avec le contrôle du débourrement.

En conclusion, nous avons pu identifier 5 nouvelles familles de miARNs (miR159, miR166, miR399, miR477 et miR8175) encore jamais décrites dans le contrôle du débourrement du rosier. L'ensemble de ces familles forment des candidats d'intérêts dans notre étude compte tenu de leurs liens avec le métabolisme de l'ABA, l'interaction SL et phosphate, la morphogenèse foliaire ou encore le flux d'eau au sein des plantes. Elles viennent s'ajouter au deux familles (miR156 et miR164) déjà rapportées comme intervenant dans ce processus chez d'autres espèces que le rosier.

Nous nous sommes, dans la partie ci-dessus, attachés à présenter les miARNs exprimés dans les bourgeons de rosier. Ceux-ci ciblent des gènes cibles qui interviennent dans les voies de régulation du débourrement par les hormones (3 gènes), les glucides (2 gènes), les ROS (2 gènes) ainsi que dans le contrôle du cycle cellulaire (2 gènes). Nous allons, à présent, discuter du rôle potentiel dans le contrôle du débourrement de ces neufs couples miARNs/gènes cibles identifiés sur la base de la littérature.

Dans la voie de régulation hormonale, les deux premiers couples identifiés font intervenir deux gènes impliqués dans la voie des cytokinines, plus précisément dans la dégradation des CK (*RhCKX1*, *RhCKX6*), tous deux ciblés par miR159a_1. Les travaux de Zhao et al., (2012) chez le peuplier conforte notre résultat. En effet, chez cette espèce, miR159 cible également un gène *CKX,* et une corrélation négative de leurs expressions a été montrée en réponse aux pathogènes. Par ailleurs chez le riz, l'inactivation du miR159 par une séquence courte en tandem (STTM, Short Tandem Target Mimic) entraîne une diminution de l'expression du gène de synthèse des CK, *OsIPT9*, des gènes de la signalisation CK *OsRR9* et *OsRR33* (Zhao et al., 2017). Ces deux résultats suggèrent que miR159 promeut l'accumulation des CK et leur signalisation chez les végétaux. Chez le rosier, les CK jouent un rôle clé dans le photo-contrôle du débourrement (Roman et al., 2016). La perception de la lumière par le bourgeon induit en quelques heures l'accumulation des CK dans la tige et le bourgeon par stimulation de la transcription des gènes de synthèse *RhIPT* et la répression de la transcription des gènes de dégradation *RhCKX* (Roman et al., 2016). L'analyse des profils d'expression de miR159 et des gènes *RhCKX* au cours du débourrement contribuera à identifier le rôle de miR159 dans l'homéostasie des CK dans le bourgeon de rosier.

Le troisième couple identifié et intervenant dans la voie de régulation hormonale est impliqué dans la voie des SL (*RwMAX4*) plus précisément dans la synthèse des SL (Sorefan et al., 2003). Dans notre analyse, ce gène est prédit comme ciblé par 6 membres de la famille miR166 (miR166/miR166a/miR166a-3p/miR166e-3p/miR166h-3p/miR166m_2).

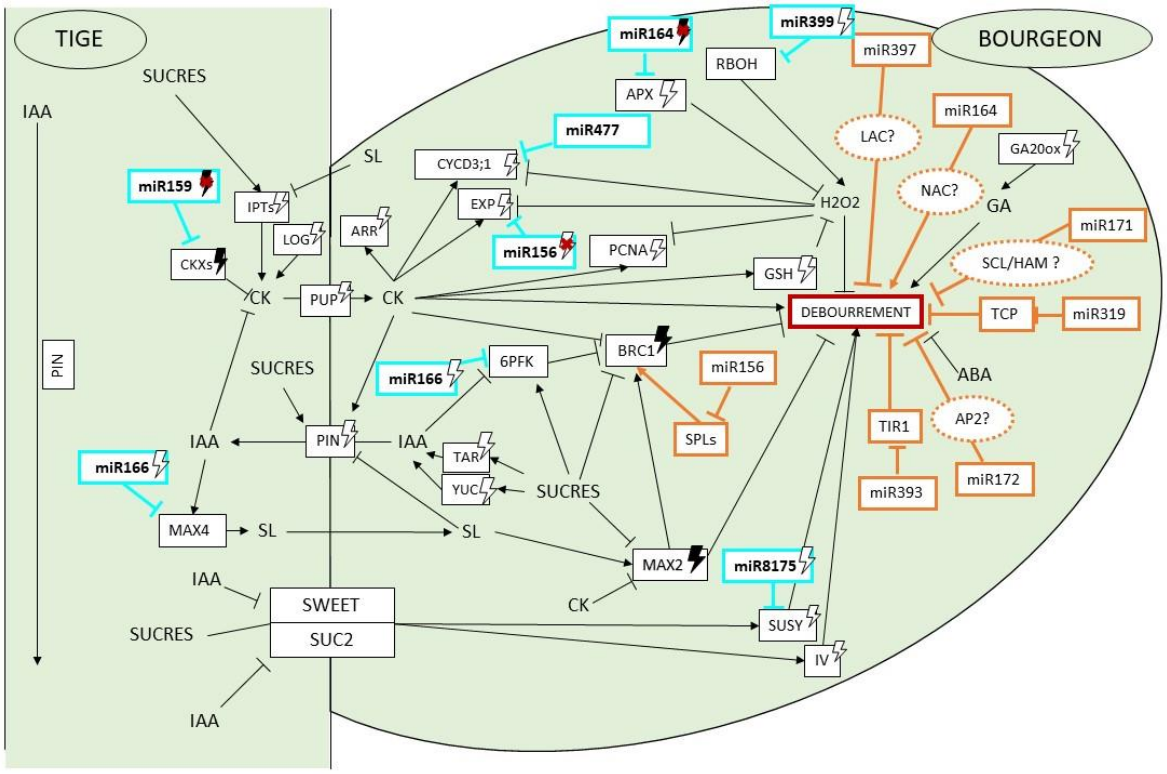

Figure 58 : **Potentiels rôles des miARNs dans le contrôle du débourrement et leur photo-régulation chez les plantes**. Adapté de la Figure 57. En bleu vif, les miARNs identifiés dans ce chapitre comme de nouveaux régulateurs putatifs dans le contrôle du débourrement. Les flèches représentent une induction, les lignes droites représentent une répression, les éclairs blancs représentent une induction par la lumière, les éclairs noirs représentent une induction par l'obscurité, les croix rouges représentent la répression du miARN.

Chez *Arabidopsis,* une analyse *in silico* montre de la même manière que le gène *AthMAX4* ainsi que les gènes *AthMAX1 et 3* seraient de potentielles cibles de la famille miR165/166 (Marzec et Muszynska, 2015), ce qui vient appuyer notre résultat et suggère que la répression du gène *MAX4* par la famille miR165/166 est conservée chez les végétaux. Jusqu'ici, l'expression du gène *MAX4 n'*a été détectée que dans les tiges de rosier et non dans les bourgeons axillaires, que ce soit par PCR quantitative ou séquençage (Dubois et al., 2012 ; Djennane et al., 2014 ; Roman et al., 2016). Une forte accumulation de ses transcrits en réponse au froid mais pas en réponse à la lumière a été mesurée dans les tiges (Djennane et al., 2014). Des analyses complémentaires sur le couple miR166/*RwMAX4* sont donc nécessaires pour comprendre son rôle dans le débourrement chez le rosier.

Dans la voie de régulation par les sucres, deux gènes, *RhSUSY*, *Rh6PFK*, sont prédits pour être ciblés par miR8175 et miR166e-5p respectivement. Aucunes données bibliographiques sur ces deux couples ne sont disponibles à ce jour et peu d'études rapportent des gènes du métabolisme des sucres pouvant être ciblés par des miARNs. Cependant, il est intéressant de noter que miR8175 a été récemment montré comme ciblant un gène du métabolisme glucidique, codant une invertase acide chez la canne à sucre (Wang et al., 2022). Ce résultat vient conforter le fait que ce miARN joue un rôle dans la régulation du débourrement par les sucres. Préalablement, il avait été démontré chez *Arabidopsis* que les sucres inhibent les miR156, 160 et 399 et active la transcription des miR319, 398 et 408 pour moduler divers processus du développement de la plante (voir pour review Wang et al., 2020a).

Notre analyse nous a permis d'identifier deux gènes*, RhAPX1* et *RhRBOHB1,* impliqués dans le métabolisme des ROS comme étant des cibles potentielles de miARNs. Le gène *RhAPX1* code l'ascorbate peroxydase, enzyme qui participe à la dégradation de l'H_2O_2 dans le bourgeon et promeut ainsi le débourrement (Porcher et al., 2020). Selon nos résultats, les transcrits du gène *RhAPX1* sont ciblés par trois membres de la famille miR164 (miR164a_4, miR164b et miR164e-5p). De la même façon, il a été montré chez le blé que miR396 est capable de cibler *APX6* ainsi que d'autres *APX* (Tyagi et al., 2020). Sur la base de ces données, nous pouvons envisager que la famille *APX* puisse être régulée par plusieurs familles de miARNs. Le gène *RhRBOHB1* code une NADPH oxydase, qui inversement promeut la production d'H_2O_2 (Sagi et Fluhr, 2001). Nos résultats montrent que son transcrit est ciblé par le miR399e_5. Il a également été montré chez le lotus *N. nucifera* que le miR319p est capable de cibler le gène *RBOHA* (Zou et al., 2020). Cela signifie que les gènes *RBOH* peuvent être cibles d'un réseau de régulation par plusieurs miARNs.

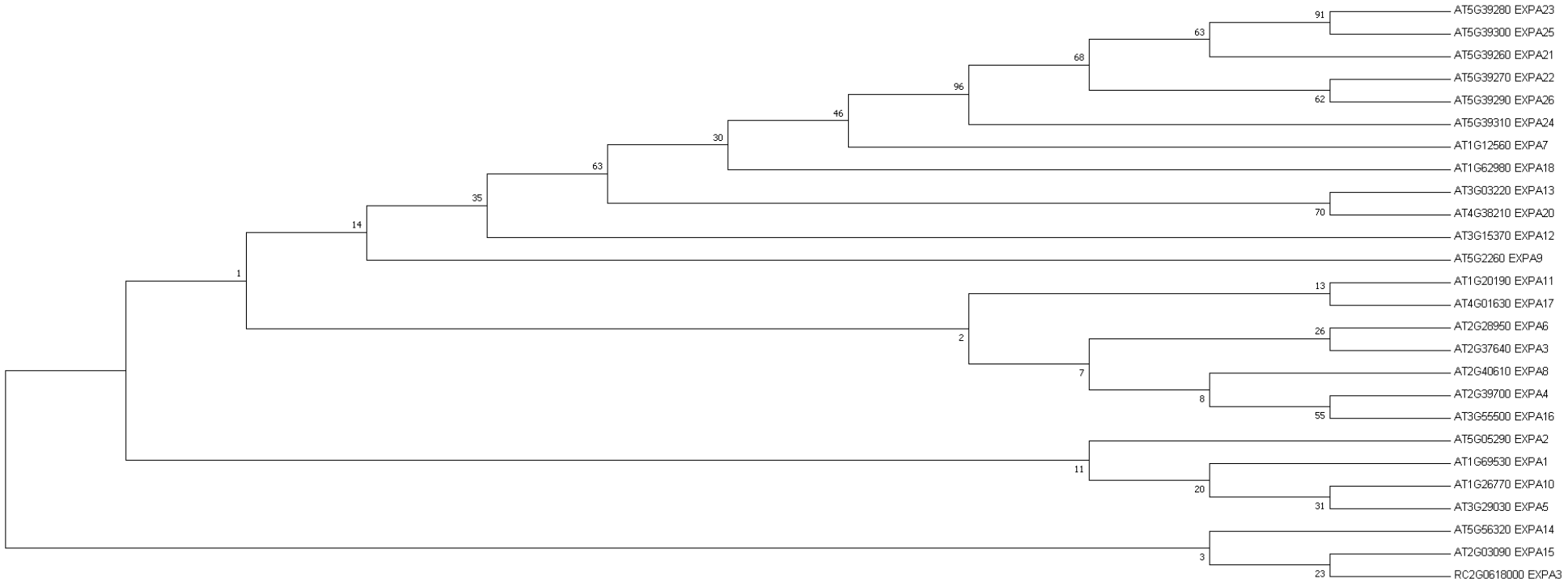

Figure 59 : **Structure de la famille multigénique des expansines.** Arbre phylogénétique (maximum de vraisemblance) des séquences protéiques des expansines issues de séquences d'*Arabidopsis thaliana* et de *Rosa chinensis*.

Enfin, les deux derniers couples identifiés font intervenir deux gènes, *RhCYCD3;2 et RhEXPA3,* impliqués dans la division cellulaire et l'expansion cellulaire respectivement qui seraient, selon notre étude, ciblés par les miARNs matures miR477 et miR156j_1. Toutefois, une telle régulation de ces gènes par des miARNs n'a pas été rapportée à ce jour dans la littérature, ce qui laisse suggérer que ces deux couples seraient spécifiques du rosier.

Notre étude révèle que même si un faible nombre de gènes appartenant au réseau de régulation du débourrement semblent sous la régulation de miARNs, ils interviennent de manière disséminée dans la majorité des voies de signalisation identifiées chez *Rosa* (Figure 58). De façon intéressante, six des neufs gènes identifiés comme cibles de miARNs sont photo-régulés (*RhCKX1*, *RhCKX6*, *RhCYCD3;1*, *RhSUSY*, *RhEXPA3* et *RhAPX1*) (Tableau VII). Cela soulève la question de savoir si leurs miARNs associés sont également photo-régulés et s'ils pourraient de cette manière contribuer au photo-contrôle du débourrement. Des analyses transcriptomiques de la photo-régulation de l'expression de ces miARNs chez le rosier sont nécessaires pour valider ces hypothèses. C'est ce que nous allons étudier dans le chapitre suivant.

De plus, deux miARNs identifiés ici, miR156 et miR164 ont déjà été décrits comme jouant un rôle dans le contrôle de la ramification (Tableau I en introduction). Tandis que le membre *Rosa* miR156j_1 et les 3 membres *Rosa* miR164 (miR164a_4, miR164b et miR164e-5p) sont prédits, dans notre étude, comme pouvant se fixer à leurs cibles conservées *SPL* et *NAC* (Laufs et al., 2004 ; Wang et Wang 2015 ; Blein et Laufs, 2016 ; Xu et al., 2016), de nouvelles cibles ont également été identifiées : *RhEXPA3* et *RhAPX1* respectivement. Ces deux gènes sont induits 24 heures après décapitation à la lumière chez *Rosa*, et sont impliqués dans l'expansion cellulaire et la détoxification des ROS respectivement (Tableau VII ; Roman et al., 2016 ; Roman et al., 2017 ; Porcher et al., 2020).

Afin d'analyser si les orthologues de ces deux gènes *RhEXPA3* et *RhAPX1* possèdent des sites de reconnaissance de miR156 et miR164, nous avons recherché leurs séquences chez *Arabidopsis*. Pour cela, nous avons tout d'abord réalisé un arbre phylogénétique en utilisant les séquences protéiques de toutes les expansines annotées chez *Rosa chinensis* et *Arabidopsis thaliana* (Figure 59). Le gène *AthEXPA15* partage la plus grande similarité de séquence avec le gène *RhEXPA3*. La recherche d'orthologue de *RhAPX1* chez *Arabidopsis* a déjà été réalisée (Porcher et al., 2020). Nous avons réalisé un alignement de la séquence nucléotidique du site de fixation du miR156j_1 du gène *RhEXPA3* avec la séquence nucléotidique de l'orthologue d'*Arabidopsis AthEXPA15*. Le site de fixation de miR156j_1 se trouve dans la partie codante de la séquence nucléotidique de *RhEXPA3* (CDS). Nous avons observé des différences entre les séquences nucléotidiques correspondant au site de fixation du miR156j_1 des gènes *RhEXPA3* et *AthEXPA15.* De manière intéressante, l'orthologue d'*Arabidopsis AthEXPA3* ne possède pas de site de fixation pour ce miARN (Figure 60).

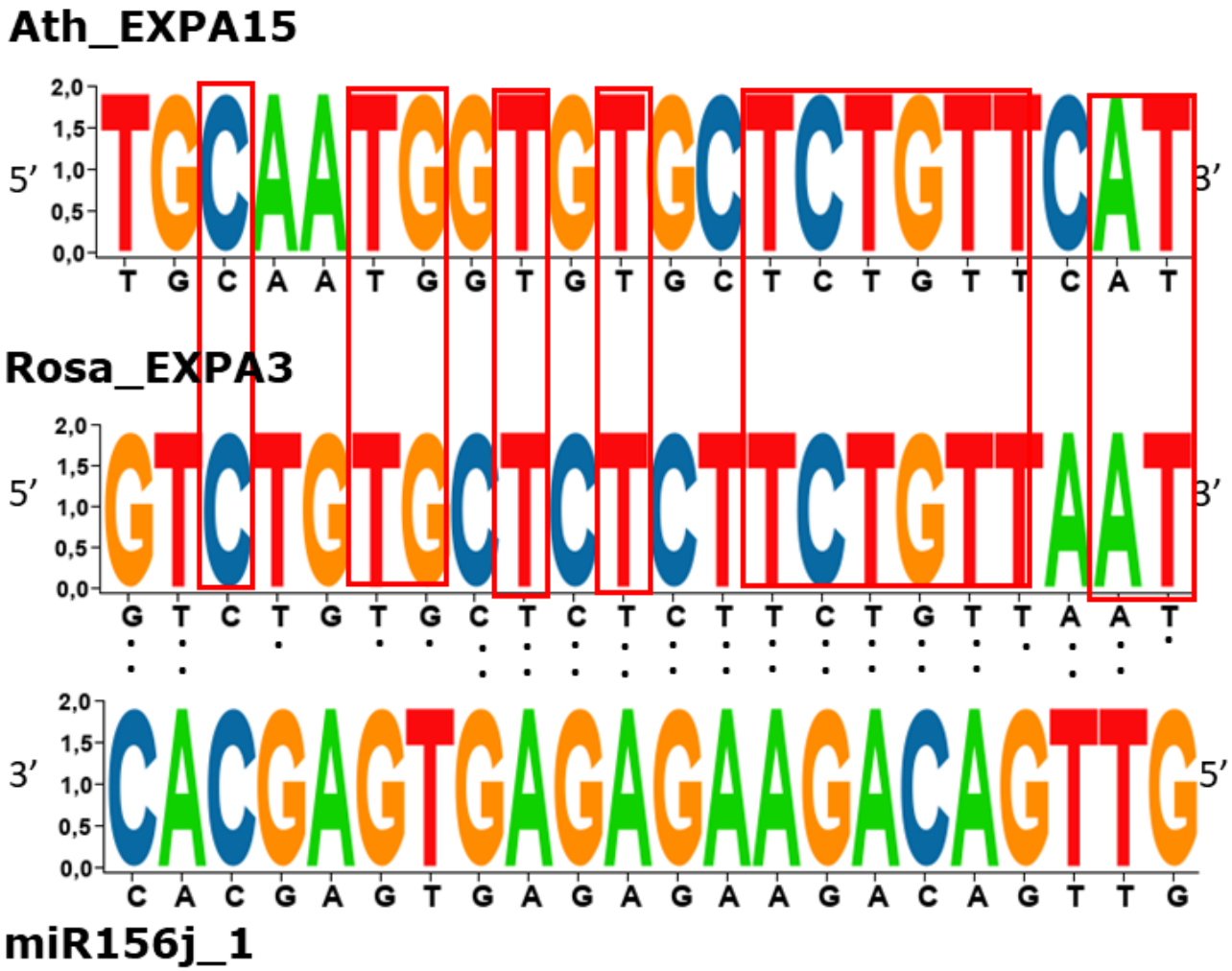

Figure 60 : **Alignement du miR156j_1 avec son potentiel site de reconnaissance sur la séquence de *RhEXPA3* et comparaison avec la séquence nucléotidique du gène orthologue chez *Arabidopsis AthEXPA15*.** Les cadres rouges représentent les similarités de séquences entre *Arabidopsis* et *Rosa chinensis*.

De même pour *AthAPX1*, nous avons réalisé l'alignement avec le miR164a_4 (Figure 61). Nous observons également des différences entre les séquences nucléotidiques correspondant au site de fixation du miR164a_4 des gènes *RhAPX1* et *AthAPX1*. Le site de fixation se trouve dans la partie 3'UTR de la séquence nucléotidique. Nous avons observé la même chose pour les deux autres membres (miR164b et miR164e-5p).

Ainsi, ces résultats nous conduisent à spéculer sur ces différences observées entre les séquences orthologues de rosier et d'*Arabidopsis* qui pourraient offrir, via la fixation de miARN, une régulation supplémentaire, peut-être plus fine de ces gènes chez le rosier. Ainsi, chacun de ces 2 miARNs pourrait agir par deux voies, une voie conservée entre les espèces et ciblant les gènes *SPL* ou *NAC* et une voie n'existant pas chez toutes les espèces et ciblant chez le rosier les gènes *RhEXPA3* ou *RhAPX1*. L'existence de ces deux voies pourrait contribuer à la robustesse de l'effet du miARN sur le débourrement des bourgeons de rosier.

3. Discussion et conclusion

A ce jour, de multiples régulateurs ont été décrits comme agissant de concert pour contrôler finement, dans un réseau complexe, le débourrement des bourgeons ainsi que sa photo-régulation (Figure 57). Tandis que ce réseau intègre les connaissances acquises au niveau transcriptionnel, peu de choses sont connues sur la manière dont la régulation post-transcriptionnelle s'intègre dans ce réseau. Dans ce chapitre, nous avons apporté de nouvelles informations en intégrant la régulation post-transcriptionnelle par les miARNs dans ce réseau (Figure 56).

Dans un premier temps, nous avons cherché à vérifier si les miARNs conservés, décrits comme jouant un rôle dans la modulation de la ramification chez d'autres plantes que le rosier (Tableau I, introduction) sont également exprimés dans le bourgeon de rosier et capables de former les mêmes couples que ceux décrits dans la littérature. Nous avons ainsi pu confirmer l'expression dans le bourgeon de rosier de 7 familles de miARNs parmi les 9 rapportées comme ayant un rôle dans le contrôle du débourrement dans la littérature (Tableau VI ; miR156, miR164, miR171, miR172 miR319, miR393, miR397, miR444 et miR529). Les deux familles manquantes sont des familles qui semblent propres aux monocotylédones. Nous avons retrouvé chez ces 7 familles les mêmes gènes cibles décrits dans la littérature chez d'autres espèces. Il y a donc une conservation de ces familles ainsi que leur gènes cibles, ce qui suggère une conservation des processus de régulation chez le rosier. Ces familles ainsi que leurs gènes cibles apportent de nouveaux éléments dans l'étude du contrôle du débourrement.

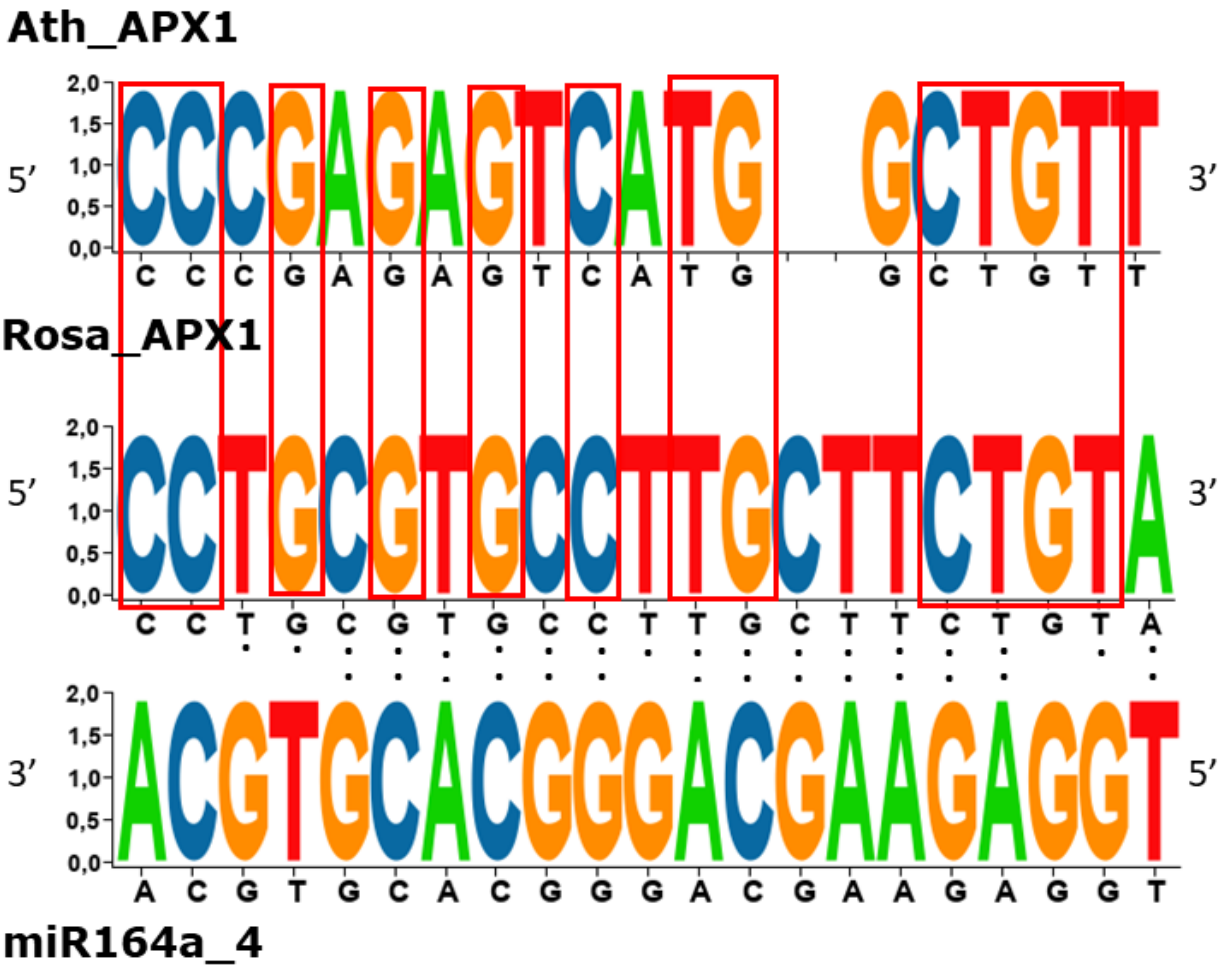

Figure 61 : **Alignement de la séquence du miR164a_4 mature avec son potentiel site de reconnaissance sur la séquence de *RhAPX1* et comparaison avec la séquence nucléotidique du gène orthologue chez *Arabidopsis AthAPX1*.** Les cadres rouges représentent les similarités de séquences entre *Arabidopsis* et *Rosa chinensis*.

Notre seconde approche de la question s'est appuyée sur les connaissances que nous avons acquises chez le rosier. L'objectif était de déterminer quels composants du réseau de régulation du photo-contrôle du débourrement déjà établi pourraient être cibles d'une régulation post-transcriptionnelle par les miARNs s'exprimant dans les bourgeons de rosier (Tableau VII).

Les miARNs que nous avons identifiés, suite à cette démarche, ont la capacité de cibler des acteurs clés dans toutes les voies importantes de la régulation du débourrement (notamment les hormones, sucres et ROS). De plus, selon la littérature, l'expression de plusieurs de ces miARNs comme miR156, miR164, miR166 et miR8175 est modulée par la lumière ce qui suggère que ceux-ci pourraient participer aux mécanismes de photo-régulation du débourrement.

Il est intéressant de noter qu'aucun gène impliqué dans les voies de l'auxine et des GA n'a été identifié comme cible potentielle des miARNs exprimés dans les bourgeons de rosier. Pourtant, de telles interactions ont été rapportées chez d'autres espèces comme le riz et d'autres processus de développement. Ainsi, il est connu que miR160 et 167 sont impliqués dans la réponse à l'auxine en ciblant des facteurs de transcriptions ARFs chez le riz dans divers processus de développement (Xie et al., 2010 ; Huang et al., 2016). Alors que des gènes tels que *YUCCA* ou *PIN* ont été démontrés importants dans le débourrement, il n'a pas été rapporté d'interaction entre des miARNs et des gènes de synthèse ou de transport de l'auxine dans la littérature.

De plus, un réseau de régulation entre les GA et le miR159 -s'exprimant aussi dans les bourgeons de rosier- a été mis en évidence chez les végétaux. Le module miR159/GAMYB serait impliqué dans la régulation de la fertilité, la germination des graines, la floraison et le développement des fruits (Millar et al., 2019 ; Yu et Wang, 2020). Les GA et le miR159 agissent de manière antagoniste, les GA activant le facteur de transcription MYB33 qui fait partie des GAMYB (Gocal et al., 2001) alors que le miR159 les réprime. De plus, le miR159 peut réguler la signalisation ABA au travers de la répression de deux gènes *MYB*. Egalement, il a été montré que le miR159 ainsi que ses gènes cibles (*MdMYB33* et *MdMYB65*) sont associés à la dormance chez le pommier. En effet, *MdMYB33* serait induit pendant la phase d'endodormance et fortement réprimé pendant la phase d'écodormance chez le pommier. Cette répression serait corrélée à l'induction de l'expression du miR159 lors de la transition entre l'endodormance et l'écodormance (Garighan et al., 2021). En accord avec ces résultats, miR159 pourrait jouer un rôle important dans le contrôle du débourrement chez le rosier au travers de la répression de gènes *MYB* et au travers de l'interaction avec la signalisation GA et ABA, hormones importantes impliquées dans le contrôle du débourrement.

L'analyse *in silico* nous a permis d'identifier un certain nombre de miARNs et leurs gènes cibles associés s'exprimant au sein des bourgeons et ainsi mettre en évidence des processus clés du débourrement sous contrôle post-transcriptionnel de miARN.

Il est intéressant désormais d'aller plus finement étudier le niveau d'expression de ces miARNs à des temps précoces au cours du débourrement sous des conditions d'éclairement contrastées. Aussi, dans le chapitre suivant, nous présentons les résultats de l'analyse transcriptomique des petits ARNs que nous avons conduite. Cette analyse a été l'occasion de confirmer des couples identifiés par l'approche *in silico*, mais aussi de mettre en évidence d'autres couples.

Une partie des résultats de ce chapitre a été publié sous forme d'article «Photocontrol of Axillary Bud Outgrowth by MicroRNAs: Current State-of-the-Art and Novel Perspectives Gained From the Rosebush Model » dans la revue Frontiers in Plant Science en Janvier 2022, disponible en Annexe 8.

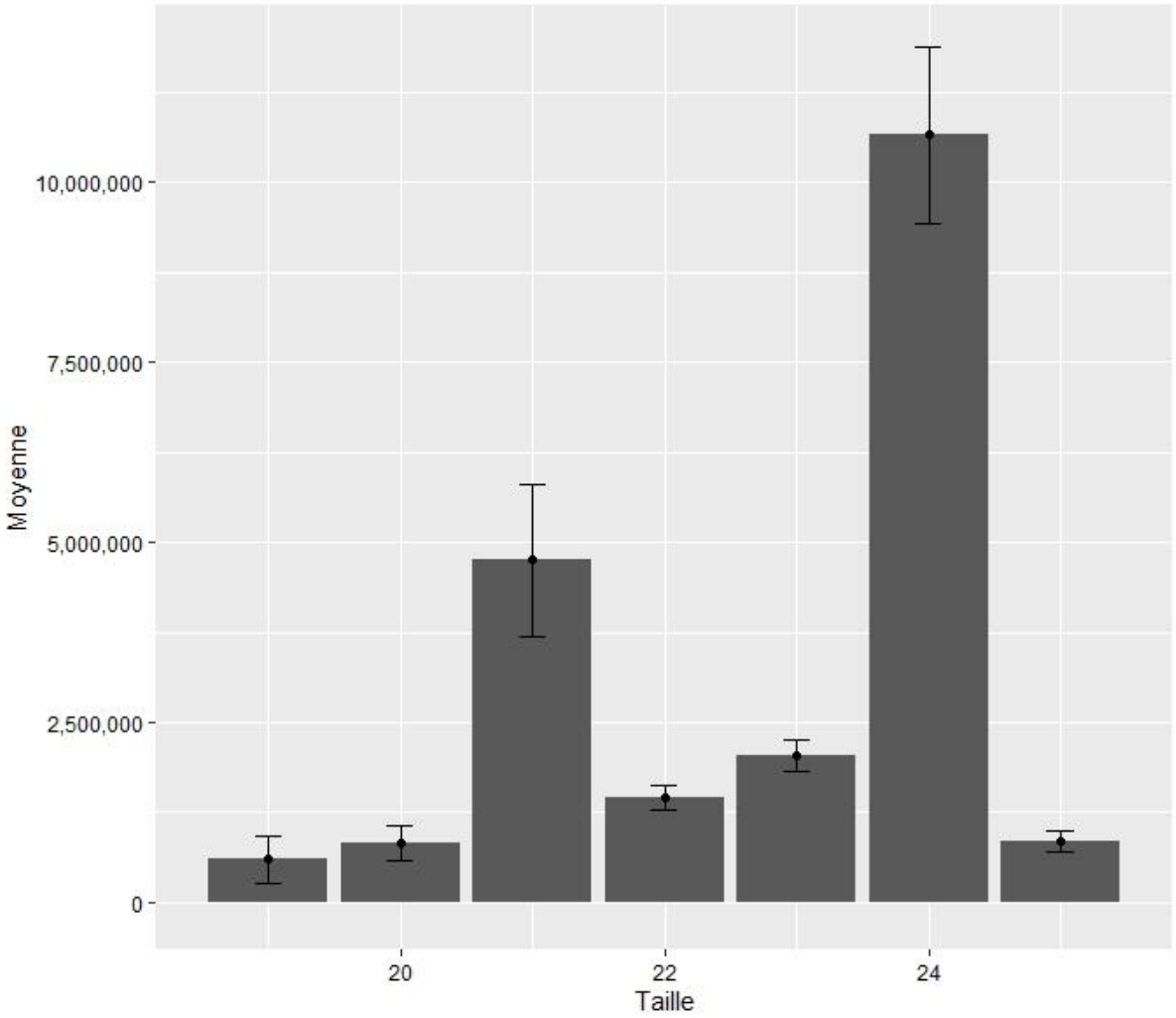

Figure 62 : **Répartition des tailles des petits ARNs dans les 9 échantillons séquencés.** Les barres d'erreur représentent l'écart-type.

Chapitre III : Etude du micro-transcriptome à une phase précoce du débourrement en réponse à la lumière

1. Introduction

Comme mentionné précédemment, il a été démontré un rôle potentiel de certains miARNs dans le développement des bourgeons axillaires chez d'autres espèces (Chapitre II). Leur action dans ce processus est attribuée à l'initiation du méristème ou au débourrement lui-même (Wang et al., 2015b). En revanche, pour d'autres miARNs, le rôle spécifique n'a pas été finement analysé (Huang et al., 2017 ; Lian et al., 2021). Il s'avère donc nécessaire d'approfondir l'étude sur le rôle des miARNs dans le contrôle du débourrement. Par ailleurs, il est important de noter qu'il existe que très peu d'études à ce jour établissant un lien établi entre miARN, lumière et débourrement.

Dans le chapitre précédent, notre analyse *in silico* nous a permis (i) d'identifier un certain nombre de miARN et gènes cibles associés conservés chez les plantes s'exprimant au sein des bourgeons axillaires de rosier et (ii) de mettre en évidence des processus clés du débourrement sous contrôle de miARNs exprimés dans les bourgeons de rosier. Dans ce chapitre, nous souhaitons nous intéresser au niveau d'expression des miARNs en fonction des conditions d'éclairement pendant les phases précoces du débourrement. L'analyse dans ce chapitre nous permettra de valider les couples identifiés par l'approche *in silico*, mais aussi de mettre en évidence de nouveaux couples.

Dans ce chapitre, plusieurs questions seront traitées : quels sont les miARNs différentiellement exprimés lors du processus de débourrement des bourgeons axillaires chez le rosier *Rosa* 'Radrazz'? Qu'en est-il de leur photo-régulation ? Quelles sont les cibles de miARNs, jouent-ils un rôle biologique dans le photo-contrôle du débourrement ?

Afin de répondre à ces questions, nous avons réalisé une approche sans *a priori*, à l'aide du séquençage haut débit des petits ARNs. Le séquençage a été réalisé sur les mêmes ARNs utilisés pour le séquençage des ARNm provenant de bourgeons 3 de rosier récoltés dans 3 conditions : juste après décapitation, 6 heures après décapitation après avoir placé les plantes à la lumière ou à l'obscurité. Le séquençage des petits ARNs a été effectué par la société BGI avec la technologie BGISEQ-500 en "single-end" avec une profondeur de séquençage de 20 millions de reads, avec 3 répétitions biologiques.

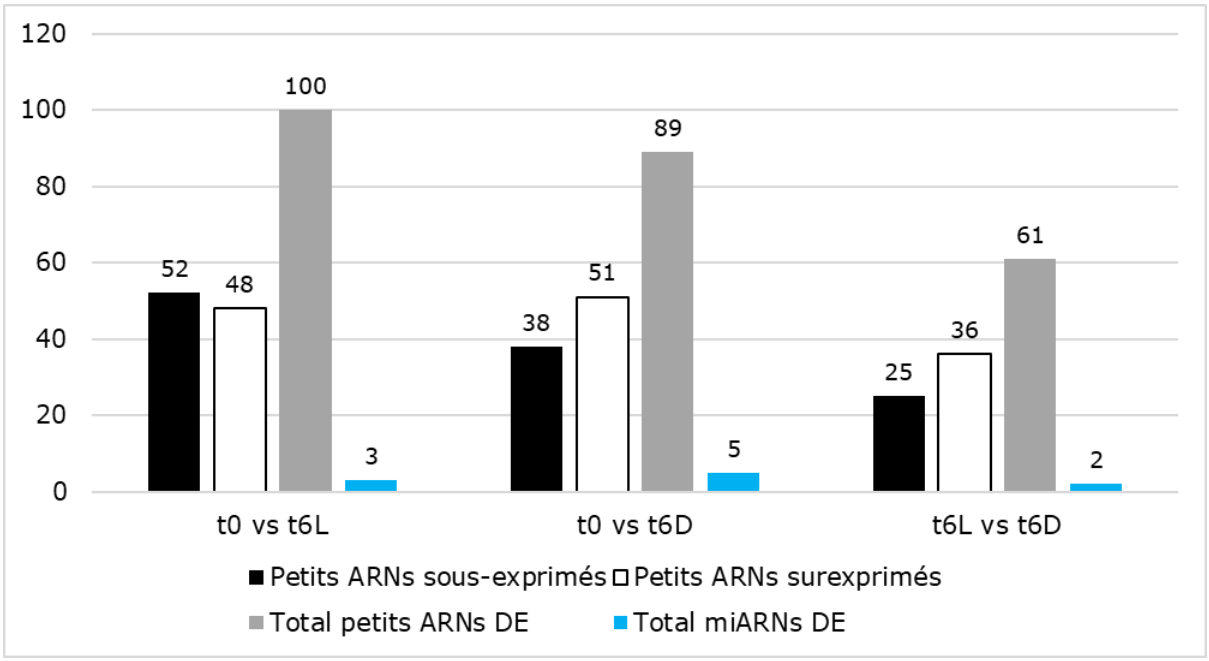

Figure 63 : **Nombre de petits ARNs différentiellement exprimés (DE) dans les bourgeons en fonction des conditions de lumière, 6h après décapitation.** Analyse DESeq2 (Log2 Fold change > ou < 0 et p-value≤0.05). La notation t0 vs t6L indique que les échantillons t6L ont été comparés à t0 pris comme référence.

.

2. Résultats

2.1. Distribution des tailles de petits ARNs

Une analyse de la distribution de la taille des lectures séquencées tous échantillons confondus révèle un pic majoritaire à 24 nucléotides (environ 10.625.000 lectures en moyenne) qui correspond à la taille canonique des siARNs, puis un deuxième pic à 21 nucléotides (environ 4.500.000 lectures) correspondant aux miARNs matures (Figure 62). Cette répartition entre siARN et miARN est commune et observée dans d'autres études. Il a été montré, par exemple, une accumulation de petits ARNs de taille 24nt 5.3 fois plus importants que les petits ARNs présentant une taille de 21 nt dans les feuilles de rosette chez *Arabidopsis* (Tabara et al., 2018).

2.2. Prédiction des petits ARNs

Les petits ARNs ont été prédits par recherche de structures secondaires de leurs précurseurs et par la taille du petit ARNs puis annotés selon plusieurs bases de données comme miRBase (v20) et Rfam (v12.0) (Kozomara et Griffiths-Jones, 2014 ; Nawrocki et al., 2015). Nous avons ainsi pu identifier dans nos échantillons (toutes conditions confondues) un total de 2358 siARNs et 270 miARNs dont 160 conservés (séquences présentes chez plusieurs espèces de plantes) et 110 nouveaux miARNs putatifs (non identifiés dans la base de données miRBase). Cependant, pour ces derniers, nous ne sommes pas certains que ce soit tous des miARNs (Tableau VIII). Un grand nombre de siARNs sont présents dans le bourgeon de rosier et pourraient potentiellement avoir un rôle dans le contrôle du débourrement. Ils pourront être étudiés ultérieurement dans un cadre autre que celui de cette thèse.

2.3. Analyse d'expression différentielle des petits ARNs

Nous avons, par la suite, suivi l'accumulation des petits ARNs dans nos 3 conditions (juste après décapitation (t0), 6 heures après décapitation à la lumière (t6L) ou à l'obscurité (t6D)) grâce à une analyse d'expression différentielle DESeq2 (Love et al., 2014) en utilisant le package Sartools sur R (Varet et al., 2016).

Cette analyse a permis d'identifier 100 petits ARNs (dont 3 miARNs) différentiellement exprimés entre t0 et 6 heures après décapitation à la lumière (t0 vs t6L), 89 (dont 5 miARNs) entre t0 et t6D et enfin 61 petits ARNs (dont 2 miARNs) entre t6L et t6D (Figure 63). Il ne semble donc pas qu'au cours du temps ou selon les conditions de lumière un nombre plus important ou plus réduit de miARNs soient impliqués dans le contrôle du débourrement.

Tableau VIII : Nombre de siARNs et de miARNs identifiés par séquençage haut-débit des petits ARNs dans les bourgeons immédiatement après décapitation de la tige (t0) et 6h plus tard sous lumière (t6L) ou obscurité (t6D).

Condition	t0	t6L	t6D
Nombre de siARNs dans le bourgeon 3	1243	1268	1329
Nombre de microARNs dans le bourgeon (mirBase+nouveaux miARNs)	270	270	273
Nombre de nouveaux miARNs	110	109	110

Il est aussi intéressant de noter que très peu de miARNs sont différentiellement exprimés (10 pour l'ensemble des 3 comparaisons sur un total de 270 miARNs identifiés dans le bourgeon) en comparaison de ce qui a été obtenu pour les siARNs (250 pour l'ensemble des 3 comparaisons sur un total de 2358 siARNs identifiés dans le bourgeon, ce qui représente 4% des miARNs et 10% des siARNs identifiés). Néanmoins, ce faible nombre de miARNs différentiellement exprimés en fonction des processus étudiés et des plantes a déjà été rapporté. En effet, il a été identifié 63 miARNs (sur 636 miARNs conservés annotés) comme différentiellement exprimés chez des plants d'*Aechmea fasciata* traités à l'éthylène, ou encore 8 miARNs (sur 300 miARNs conservés annotés) identifiés comme différentiellement exprimés chez *Brassica napus* impliqués dans la régulation de la synthèse de cire (Liu et al., 2019b ; Ding et al., 2020). Ainsi, il semble plutôt commun de retrouver un faible nombre de miARNs différentiellement exprimés par rapport au nombre de miARNs prédits dans un séquençage de petits ARNs (Snyman et al., 2017 ; Dong et al., 2020).

Les miARNs différentiellement exprimés dans nos conditions appartiennent à 5 familles de miARNs conservées : les familles miR160, miR162, miR166, miR319 et miR396. Dans le chapitre précédent, sur la base de la littérature, de ces 5 familles nous en avions identifié 3 (miR160, miR166 et miR319) ayant un rôle potentiel dans le contrôle du débourrement. En effet, pour rappel, nous avions identifié des membres de la famille miR166 prédits comme capables de cibler les gènes *MAX4* et *6PFK*, impliqués dans le contrôle du débourrement chez le rosier. De plus, la famille miR160 est une famille intéressante car les membres de cette famille peuvent cibler des ARFs, impliqués dans la voie de signalisation de l'auxine, hormone importante dans le contrôle du débourrement (Xie et al., 2010 ; Huang et al., 2016). Nous nous sommes également intéressés à la famille miR319, régulant les TCP et ayant un rôle négatif dans le contrôle du débourrement chez le thé (Liu et al., 2019a).

Les deux familles de miARNs restantes, miR162 et miR396 n'ont encore jamais décrites dans le contrôle du débourrement, elles constituent de ce fait de nouvelles familles de miARNs intéressantes à étudier dans ce processus.

Nous avons décidé de nous intéresser un peu plus précisément au profil d'expression des miARNs matures différentiellement exprimés en fonction de la condition d'éclairement selon nos résultats de séquençage haut-débit (Figure 64).

La Figure 64 présente les 7 miARNs matures différentiellement exprimés en fonction des conditions d'éclairement.

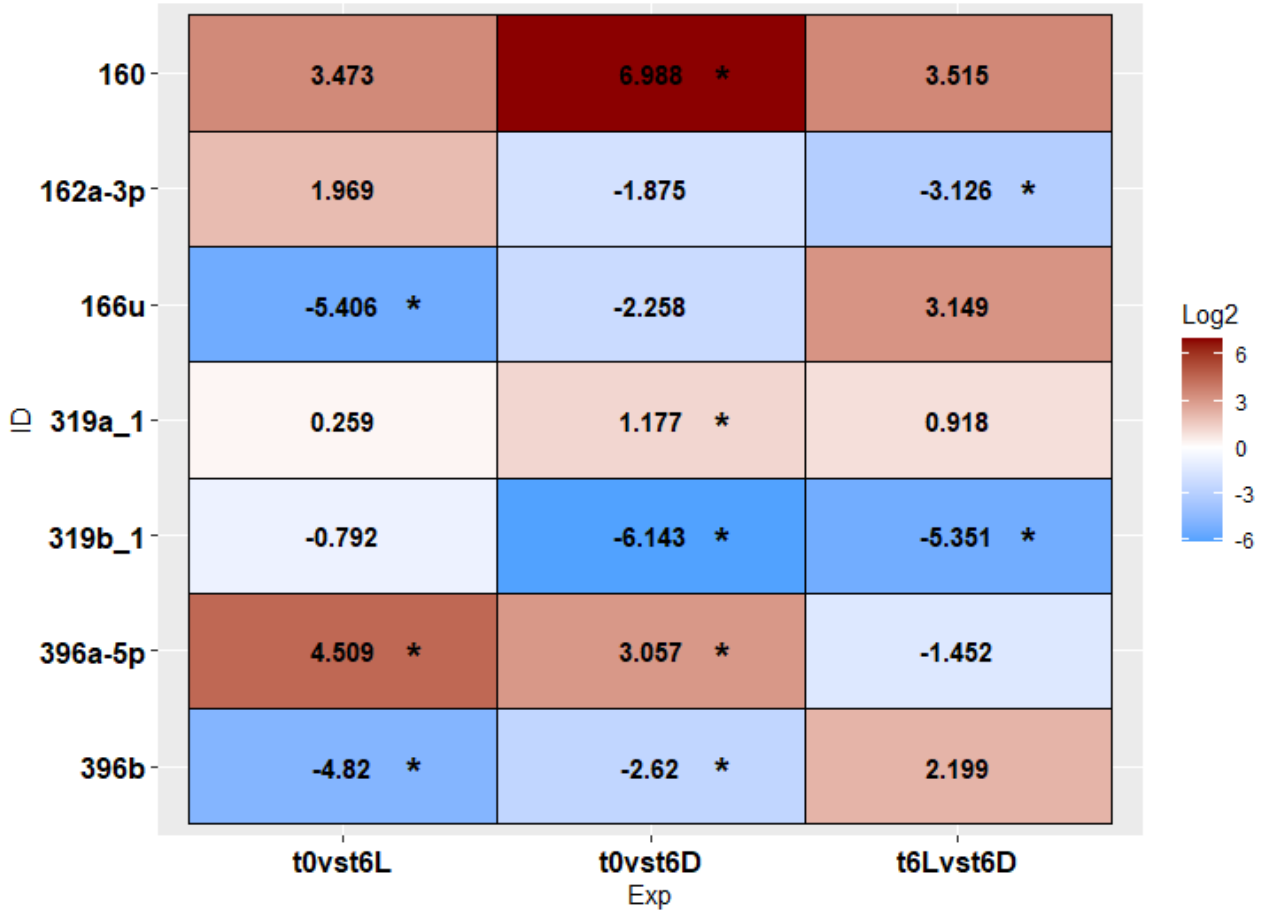

Figure 64 : **Variation de l'expression des miARNs différentiellement exprimés au cours des phases précoces du débourrement (0 et 6h après décapitation) et en fonction des conditions de lumière selon nos résultats de séquençage.** Comparaison de l'expression en Log2 Fold Change des miARNs différentiellement exprimés dans le bourgeon de rosier (Bleu : gène sous-exprimé, Rouge : gène surexprimé). Les astérisques représentent les différences significatives (p.adj≤0.05). La notation t0 vs t6L indique que les échantillons t6L ont été comparés à t0 pris comme référence.

Nous pouvons observer que les miR396a-5p et miR396b répondent de manière opposée 6h après décapitation par rapport à t0. MiR396a-5p est surexprimé à la lumière (t6L) (22 fois) et à l'obscurité (t6D) (8 fois) 6 heures après décapitation en comparaison du contrôle (t0). A l'inverse, miR396b est réprimé à t6L (33 fois) et à t6D (6.25 fois) par rapport à t0. Toutefois, aucun de ces deux miARNs matures n'est différentiellement exprimé dans la comparaison t6L vs t6D.
En raison de cette observation, nous pouvons envisager que leur différence d'expression serait davantage due à la décapitation que dépendante du facteur lumière.

Seul le miARN mature miR166u est significativement réprimé uniquement en condition lumière par rapport à t0 (43 fois moins exprimé par rapport à t0). Des membres de la famille de ce miARN sont connus pour réguler des gènes codant des facteurs de transcription HD-ZIP III (Huang et al., 2016). Les HD-ZIP III *PHABULOSA* et *REVOLUTA* sont impliqués dans l'établissement du méristème apical caulinaire (MAC) et la polarité des organes latéraux lors de l'établissement des nouvelles feuilles (McConnell et al., 2001 ; Zhang et Zhang, 2012). Ce résultat est concordant avec les études précédentes sur les processus mis en œuvre au cours du débourrement chez le rosier (Girault et al., 2008), notamment l'établissement de nouvelles feuilles dans le bourgeon après décapitation. Cette organogenèse est dépendante de l'éclairement et est complètement inhibée à l'obscurité, donc une répression par la lumière de ce miARN lèverait l'inhibition de ces gènes liés à la maintenance des méristèmes et le développement des nouvelles feuilles permettrait d'induire le débourrement.

En ce qui concerne miR160, nous pouvons observer dans la comparaison t0 vs t6D, que ce miARN est très fortement induit à l'obscurité (126 fois plus exprimé). Ce résultat suggère que ce miARN jouerait un rôle inhibiteur du débourrement. Cette famille réprime les gènes codant les facteurs de transcription *ARFs* (*AUXIN RESPONSE FACTOR*) impliqués dans la signalisation auxine (Huang et al., 2016). Ceci n'est pas concordant avec l'expression du miR160 car l'induction de ce miARN entraîne la répression de ces *ARFs* et donc entraînerait une réduction de l'induction de gènes de réponse à l'auxine par les ARFs. Nous pouvons supposer que le miR160 pourrait jouer un rôle dans le contrôle du débourrement par d'autres gènes cibles que les *ARFs.*

De la même manière, nous pouvons observer que miR319a_1 est surexprimé 6 heures après décapitation à l'obscurité par rapport à t0 (2.5 fois plus exprimé) alors qu'au contraire miR319b_1 est fortement réprimé (125 fois moins exprimé). Par ailleurs, miR319b_1 est également réprimé dans la comparaison t6L vs t6D (40 fois moins exprimé). Cette régulation de l'accumulation de ce miARN mature dans le bourgeon en réponse à la lumière suggère son implication dans le photo-contrôle du débourrement.

Il a été montré chez *Agrostis stolonifera* que la surexpression du miR319 entraîne une légère réduction du tallage (Zhou et al., 2013b). De même, une surexpression du miR319 entraîne une réduction de la longueur des bourgeons de talles et une diminution du nombre de talles chez le riz (Wang et al. 2021). Ce phénotype est corrélé avec l'augmentation de l'expression de *OsTCP21*. Chez le thé *Camellia sinensis*, Liu et al., 2019a rapportent que l'expression de *MIR319c* est significativement réduite pendant le débourrement alors que sa cible *TCP2* est significativement induite. Par ailleurs, il a été montré que le miR319 est réprimé dans les bourgeons qui débourrent chez la canne à sucre (Ortiz-Morea et al., 2013). L'ensemble de ces données renforce notre hypothèse que miR319 agirait comme un inhibiteur du développement des bourgeons chez le rosier. Ces résultats sont concordants avec l'expression du miR319a_1 celui-ci étant induit dans le bourgeon à l'obscurité 6 heures après décapitation chez le rosier. Son induction permettrait donc d'inhiber le débourrement à l'obscurité, via potentiellement une répression de l'élongation du bourgeon ou d'autres mécanismes restant à déterminer. Ce résultat le positionne comme un bon candidat dans l'étude du contrôle du débourrement.

Les résultats que nous obtenons pour miR319b_1 ne sont pas concordants avec ceux de la littérature (Ortiz-Morea et al., 2013 ; Liu et al., 2019a). Nous observons en effet que l'expression de miR319b_1 est inhibée à l'obscurité 6 heures après décapitation, ce qui signifie que ce miARN aurait potentiellement un rôle différent de miR319a_1 et agirait potentiellement en réprimant un inhibiteur du débourrement.

Enfin, le miR162a-3p est réprimé dans la comparaison t6L vs t6D (9 fois moins exprimé à l'obscurité) (Figure 64). Le miR162 est connu pour réguler des gènes liés à la biogenèse des miARNs, par la répression du gène *DCL1* (*DICER-LIKE 1*). Une perte de fonction partielle de *DCL1* chez *Arabidopsis* entraîne une diminution de la quantité de miARNs et entraîne un phénotype pléiotropique sur le développement végétatif et reproducteur des plantes (Schauer et al., 2002). En particulier, la perte de fonction partielle *dcl1-8* entraîne notamment chez les plantules d'*Arabidopsis* l'absence de méristème ou des cotylédons fusionnés voire l'absence de cotylédons (Ray et al., 1996). Ce phénotype suggère que ces miARNs sont notamment nécessaires au développement des méristèmes et donc que les miARNs peuvent avoir un rôle dans le contrôle du débourrement. DCL1 régulant l'accumulation de miARN, ceci entraîne une boucle de rétro-régulation entre *DCL1* et son miARN régulateur, miR162 (Xie et al., 2003).

Le fait que miR162a-3p soit réprimé à l'obscurité 6 heures après décapitation fait de ce miARN un bon candidat dans l'étude du photo-contrôle du débourrement. A ce jour, il n'a pas été montré de lien direct entre le miR162 et des acteurs connus du débourrement, cependant il est possible que ce miARN ait une action en amont dans le contrôle du débourrement et serait nécessaire au maintien de l'homéostasie des miARNs impliqués dans le contrôle du débourrement.

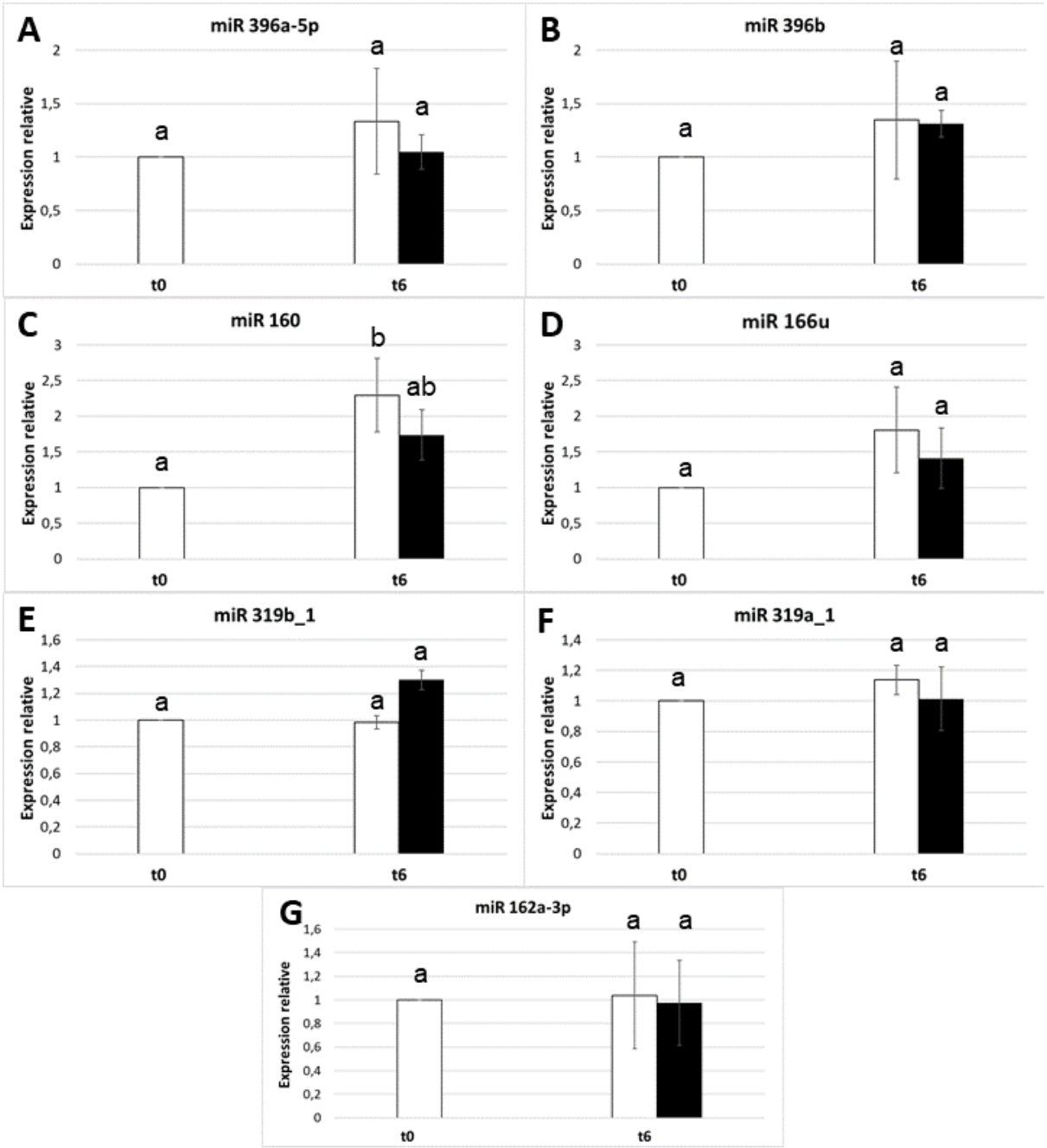

Figure 65 : **Analyse de l'accumulation par qPCR des miARNs matures, identifiés comme différentiellement exprimés dans le séquençage des petits ARNs, sur les ARN provenant des échantillons utilisés pour le séquençage.** Evolution de l'expression de miR396a-5p (A), miR396b (B), miR160 (C), miR166u (D), miR319b_1 (E), miR319a_1 (F), miR162a-3p (G) dans les bourgeons B3 de rosier juste après la décapitation (t0) puis à 6h (t6) en condition lumière (barre blanche) ou obscurité (barre noire). Les données issues de trois répétitions biologiques indépendantes représentent les expressions relatives moyennes des transcrits ± l'erreur standard en référence à la condition t0. Les astérisques représentent les différences significatives ($p \leq 0.05$)

Cette première analyse nous a permis d'identifier 7 miARNs matures qui se révèlent intéressants compte tenu de leur profil d'expression en réponse à des conditions de lumière contrastées dans les phases précoces du débourrement. Deux miARNs (miR396a-5p et 396b) présentent un profil de réponse à un effet "décapitation" alors que les 5 autres sont photo-régulés (miR160, miR162a-3p, miR166u, miR319a_1 et miR319b_1).

2.4. Validation des expressions des miARNs par qPCR

Afin de valider les résultats de séquençage, l'expression des 7 miARNs matures différentiellement exprimés a été étudiée par PCR quantitative grâce à la méthode de stem-loop RT-PCR permettant de quantifier les miARNs matures (Matériel et Méthode Partie 7.1.3.). Les stem-loop RT-PCR ont été réalisées sur les ARNs utilisés pour le séquençage dans toutes nos conditions (juste après décapitation (t0), 6 heures après décapitation à la lumière (t6L) ou à l'obscurité (t6D)). Les amorces ont été dessinées spécifiquement selon la séquence de ces miARNs.

Les résultats sont présentés Figure 65. Nous pouvons noter que seul miR160 présente un différentiel d'expression, à l'inverse des six autres miARNs (miR162a-3p, miR166u, miR319a_1, miR319b_1, miR396a-5p et miR396b) (Figure 65). Nous observons que miR160 est significativement surexprimé à la lumière, 6 heures après décapitation (2 fois plus exprimés). Ce profil d'expression du miR160 obtenu par PCR stem-loop quantitative n'est pas en accord avec le résultat du séquençage (considéré comme surexprimé à t6D par rapport à t0 dans le séquençage). De la même façon, concernant les 6 autres miARNs, nous ne parvenons pas à confirmer par qPCR stem-loop les résultats issus du séquençage.

Nous avons pu constater que ces 7 miARNs sont chacun membres d'une famille comptant entre 5 et 14 membres présentant une forte similarité de séquence (Figure 66). Nous pouvons émettre l'hypothèse que deux des amorces utilisées pour la RT-stem loop qPCR, l'amorce RT-stem loop ou l'amorce sens de qPCR, toutes deux dessinées spécifiquement sur un membre spécifique aurait la capacité de s'hybrider également aux autres membres de cette même famille (Figure 66). Cela signifierait que nous ne quantifions pas uniquement le miARN mature venant d'un précurseur d'intérêt mais plus largement l'accumulation de la totalité des miARNs membres d'une même famille et provenant de plusieurs précurseurs. Nous ne pouvons donc pas écarter la possibilité que les gènes codant ces précurseurs présentent des expressions inverses de celles du précurseur d'intérêt. En effet, grâce à l'alignement des séquences, nous pouvons observer que les amorces sens utilisées peuvent s'hybrider à plusieurs membres de la famille du miARN. Cela est vrai pour presque la totalité des miARN matures que nous avons suivis en qPCR excepté pour le miR162a-3p (Figure 66 E). Dans ce dernier cas, l'amorce peut également s'hybrider uniquement au miR162-3p mais pas aux autres membres de la famille.

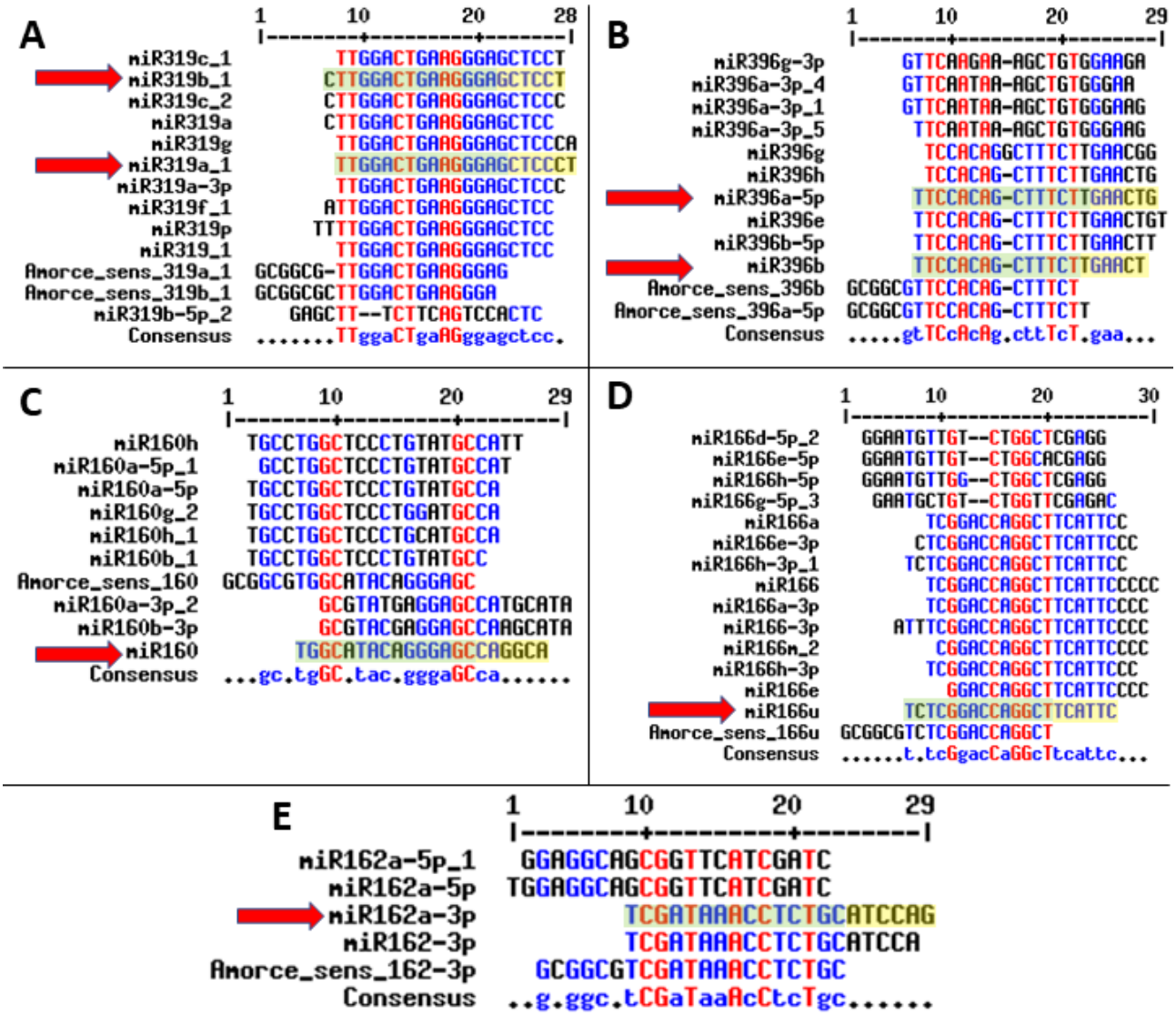

Figure 66 : **Alignement des séquences de miARNs matures appartenant aux familles des miARNs identifiés comme différentiellement exprimés avec les séquences des amorces sens dessinées spécifiquement sur ces miARNs différentiellement exprimés.** Alignement des séquences des miARNs matures des familles miR319 (A), miR396 (B), miR160 (C), miR166 (D), miR162 (E). Réalisé grâce à l'outil Multalin (http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/ , Corpet, 1988). Les flèches rouges représentent le miARN dont les amorces ont été dessinées en premier lieu. Les amorces RT-stem loop ont été dessinées sur les 6 derniers nucléotides du miARN d'intérêt surlignés en jaune. Les séquences du miARN d'intérêt pour dessiner les amorces sens pour la qPCR sont surlignés en vert.

Il en est de même pour le miR160, dont nous pouvons valider son expression par PCR quantitative (Figure 66 C), pour lequel l'amorce RT-stem loop serait en mesure de s'hybrider au miR160-3p.

Il est envisageable que les membres d'une même famille soient régulés différemment dans les conditions de traitement que nous utilisons. Ceci expliquerait la difficulté que nous rencontrons à valider par qPCR les différentiels d'expression obtenus du séquençage.

En effet, nous avons pu voir que les miR396a-5p et 396b avaient des profils d'expression inverse, ainsi que pour les miR319a_1 et 319b_1. Ces différences de profil d'expression pourraient donc "effacer" le profil d'expression du miARN mature d'intérêt par qPCR.

Pour la suite des résultats, nous considérerons donc que le suivi d'expression des miARNs par stem loop qPCR reflète l'expression de la famille miARN et non celle d'un membre spécifique.

2.5. Suivi de l'expression des familles de miARNs au cours du débourrement

Précédemment, les données du micro-transcriptome nous ont renseigné sur l'expression des miARNs aussitôt la décapitation (t0) et 6h après. Il a été établi qu'un bourgeon de rosier est considéré comme débourré à 96 heures après décapitation, lorsque les premières feuilles sortent des écailles (Girault et al., 2008). Pour compléter notre première analyse sur l'expression des miARNs, nous avons suivi l'expression des familles de miARNs différentiellement exprimés sur une cinétique de 96 heures après la décapitation à la lumière ou à l'obscurité (Figure 67).

Nous pouvons tout d'abord noter que la famille miR319 est 3 fois moins exprimée à t96L par rapport à t0 (Figure 67 B). Cette famille de miARN serait donc inhibée par la lumière en fin de cinétique de débourrement.

De plus, le miR162 est induit à t24L par rapport à t0 (1.7 fois plus exprimé). En comparant son expression à 24 heures après décapitation à l'obscurité par rapport à la lumière au même point de cinétique (t24L vs t24D), nous observons que ce miARN est significativement réprimé (Figure 67 E). Ces résultats sont concordants avec les résultats du séquençage où le miR162a-3p est significativement réprimé 6 heures après décapitation et exposition à l'obscurité (Figure 64).

Concernant les autres miARNs, les familles ne présentent pas de différence d'expression significative. Par exemple, la famille miR396 ne semble pas être différentiellement exprimée au cours de la cinétique de débourrement à la lumière ou à l'obscurité. Cela peut s'expliquer du fait que miR396a-5p est induit tandis que miR396b est réprimé à 6 heures après décapitation par rapport à t0 selon nos résultats du séquençage des petits ARNs. Les variations d'expression de ces différents miARNs s'annuleraient aboutissant donc à une absence de différentiel pour la famille entière (Figure 67 A).

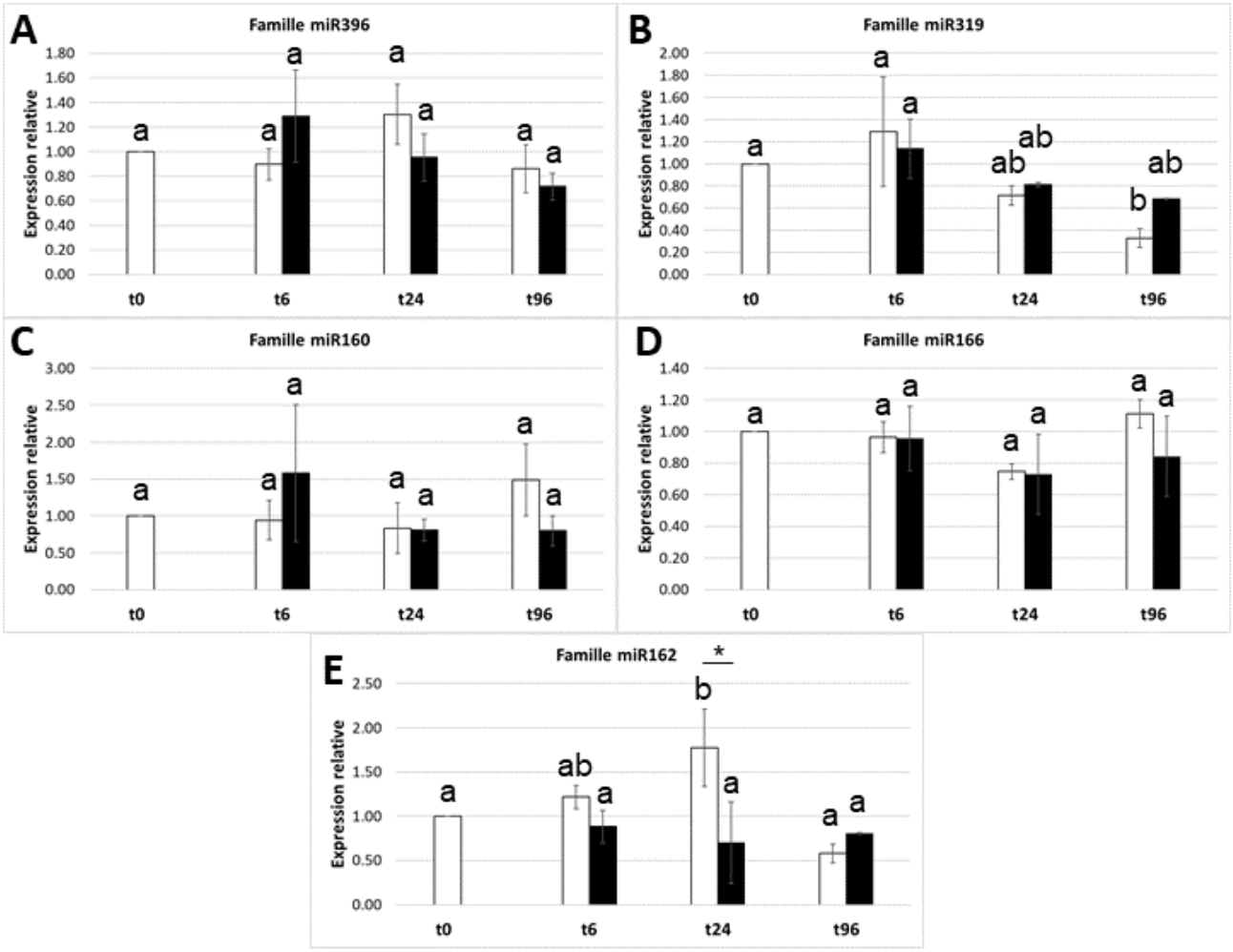

Figure 67 : **Variation de l'expression de familles de miARNs identifiés comme différentiellement exprimés dans le séquençage des petits ARNs, au cours du débourrement après décapitation.** Evolution de l'expression des familles miR396 (A), miR319 (B), miR160 (C), miR166 (D), miR162 (E) dans les bourgeons B3 de rosier juste après la décapitation (t0) puis 6h, 24h et 96h plus tard (t+) en condition lumière (barre blanche) ou obscurité (barre noire). Les données issues de trois répétitions biologiques indépendantes représentent les expressions relatives moyennes des transcrits ± l'erreur standard en référence à la condition t0. Les astérisques représentent les différences significatives ($p \leq 0.05$).

2.6. Recherche de gènes cibles

Nous avons identifié 7 miARNs différentiellement exprimés dans notre séquençage des petits ARNs provenant de bourgeons placés à la lumière et/ou à l'obscurité à un temps précoce dans le processus du débourrement. La validation de l'accumulation des miARNs par stem-loop RT-PCR sur les différentes répétitions biologiques ne nous a pas permis de confirmer le différentiel d'expression des miARNs étudiés. Cela pourrait s'expliquer par la forte similarité des séquences des différents membres de la famille qui induit que le niveau d'accumulation des miARNs correspondent non pas à un unique membre mais à l'ensemble de ces membres.

Nous souhaitons à présent connaître l'identité de leurs potentiels gènes cibles afin de savoir quels gènes ces miARNs pourraient réguler et étudier leurs rôles potentiels dans le contrôle du débourrement du bourgeon de rosier. Pour cela, nous avons confronté les séquences de ces miARNs matures contre le génome de référence du rosier, le génome de *Rosa chinensis* (Hibrand St-Oyant et al., 2016) grâce à l'outil PsRNA Target (Dai et al., 2018 ; https://www.zhaolab.org/psRNATarget/home).

Au total, 159 gènes sont potentiellement ciblés par les 7 miARNs différentiellement exprimés dans le séquençage (tous les résultats sont présentés en Annexe 7). Les principaux gènes cibles dont la fonction présente un intérêt en lien avec le débourrement sont résumés dans le Tableau IX. Nous pouvons confirmer tout d'abord des cibles connues et conservées de certains miARNs, comme les gènes *TCP2* et *TCP*4 et *MYB33* (RC1G0131600) pour les miR319a_1 et miR319b_1 et uniquement *TCP2* pour le miR319b_1, 10 *GRFs* pour les miR396a-5p et miR396b, *DCL1* pour le miR162a-3p et enfin des *HD-ZIP III* dont les gènes *PHABULOSA (PHB)*, *REVOLUTA (REV)* et *CORONA (CNA)* pour le miR166u (Tableau IX). Les miARNs 396a-5p et 396b ont exactement les mêmes gènes cibles. Étonnement, le membre de la famille miARN 160 *miR160* n'a pas été identifié comme ciblant des facteurs de transcription *ARFs* (AUXIN RESPONSE FACTOR) alors que d'autres membres de la famille miR160 ont la capacité de reconnaître les ARFs. De plus, nous pouvons remarquer Figure 66 que les miR160, miR160b-3p et miR160a-3p_2 se distinguent par leurs séquences des autres membres de la famille miR160. Nous pouvons supposer que par leur différence de séquences, ces miARNs ont des gènes cibles différents des autres membres de la famille et donc une fonction différente.

De manière intéressante, notre analyse révèle aussi de nouvelles cibles, différentes des cibles conservées déjà décrites dans la littérature.

Tableau IX : **Principaux gènes cibles homologues intéressants sur le génome de *Rosa chinensis* par analyse PsRNA Target des miARNs *Rosa* 'Radrazz' différentiellement exprimés dans le séquençage des petits ARNs.** Les numéros d'accession correspondant des homologues *Rosa chinensis* sont indiqués.

Nom du miARN	Numéro d'accession du gène ciblé	Nom du gène ciblé	Également ciblé par le miARN
miR160	RC1G0176700	*FAR1-related sequence 3*	
	RC2G0528200	*F-box family protein*	
	RC6G0259000	*NAC domain containing protein 82*	
	RC7G0357800	*FAR1-related sequence 5*	
	RC7G0455100	*MATE efflux family protein*	
miR162a-3p	RC1G0395300	*DCL1*	
	RC1G0403800	*kow domain-containing transcription factor 1 (KTF1)*	
	RC1G0555600	*WD-40 repeat family protein / notchless protein*	
	RC2G0503400	*Ergosterol biosynthesis ERG4/ERG24 family*	
	RC7G0390000	*chloroplast heat shock protein 70-2*	
miR166u	RC1G0492900	*N2*	
	RC2G0174500	*AP2/B3-like transcriptional factor family protein*	
	RC2G0477300	*Homeobox-leucine zipper family protein (CORONA)*	
	RC5G0148400	*HD-ZIPIII (PHABULOSA)*	
	RC5G0375400	*homolog of histone chaperone HIRA*	
	RC5G0419000	*NIMA (never in mitosis)*	
	RC5G0507100	*HD-ZIPIII (REVOLUTA)*	
	RC6G0116100	*alpha-amylase-like*	
	RC7G0319000	*NIMA (never in mitosis)*	
miR319a_1	RC1G0131600	*MYB33*	319b_1
	RC1G0264500	*myb-like HTH transcriptional regulator family protein*	
	RC1G0384100	*probable alkaline/neutral invertase F*	
	RC1G0509100	*NITRIC OXIDE SYNTHASE 1*	
	RC1G0539000	*homolog of DNA mismatch repair protein MSH3*	
	RC2G0087200	*Lycopene beta/epsilon cyclase protein*	
	RC2G0542000	*myb domain protein 101*	
	RC3G0302000	*iron regulated 2*	319b_1
	RC3G0302300	*iron regulated 2*	319b_1
	RC5G0134300	*TCP2*	319b_1
	RC5G0279600	*TCP4*	
	RC6G0050900	*iron regulated 2*	319b_1
	RC6G0519900	*SBP (S-ribonuclease binding protein) family protein*	
	RC7G0284200	*Mannose-6-phosphate isomerase*	319b_1
	RC7G0529900	*pectinesterase/pectinesterase inhibitor 41*	319b_1
miR319b_1	RC1G0306300	*cytochrome P450*	
	RC2G0586200	*galacturonosyltransferase 9*	
	RC2G0590400	*Malectin/receptor-like protein kinase family protein*	
	RC6G0440500	*profilin 5*	
	RC7G0209800	*phospholipase D beta 1*	

Nom du miARN	Numéro d'accession du gène ciblé	Nom du gène ciblé
miR396a-5p/miR396b	RC0G0131600	*GRF5B*
	RC1G0304400	*GRF9*
	RC1G0530500	*AGAMOUS-like 6*
	RC1G0542700	*cytochrome P450*
	RC1G0584300	*GRF7*
	RC1G0598900	*GRF5A*
	RC2G0010800	*heat shock protein 70B*
	RC2G0051700	*phosphoenolpyruvate carboxylase 3*
	RC2G0093200	*cytochrome P450*
	RC2G0093600	*GRF6*
	RC2G0096600	*L-CYSTEINE DESULFHYDRASE*
	RC2G0208700	*acyl-CoA-binding domain 3*
	RC2G0220500	*GRF1A*
	RC2G0362600	*dehydroquinate dehydratase*
	RC2G0363300	*dehydroquinate dehydratase*
	RC2G0385300	*phosphoenolpyruvate carboxylase 1*
	RC2G0499000	*Coatomer*
	RC2G0499400	*Coatomer*
	RC2G0545700	*Ribosomal protein L6 family (RPL6)*
	RC2G0689500	*Phosphoglycerate mutase family protein*
	RC3G0051700	*ALWAYS EARLY 4*
	RC3G0087500	*genomes uncoupled 1*
	RC3G0111300	*RHO guanyl-nucleotide exchange factor 14*
	RC3G0196800	*Aldolase-type TIM barrel family protein*
	RC3G0236600	*GRF3*
	RC3G0260300	*Ribonuclease II/R family protein*
	RC3G0324800	*Probable L-cysteine desulfhydrase*
	RC3G0404600	*ILITYHIA*
	RC4G0130300	*Putative GDP-L-fucose synthase 2*
	RC4G0233800	*Homeotic gene regulator*
	RC4G0305600	*L-cysteine desulfhydrase*
	RC4G0348200	*Rubber elongation factor protein (REF)*
	RC4G0468300	*carbonic anhydrase 2*
	RC5G0044800	*terpene synthase 14*
	RC5G0322500	*L-cysteine desulfhydrase*
	RC5G0322600	*L-cysteine desulfhydrase*
	RC5G0528200	*ubiquitin-associated (UBA)/TS-N domain-containing protein*
	RC5G0575600	*copper transporter 1*
	RC6G0009300	*eukaryotic translation initiation factor SUI1 family protein*
	RC6G0138400	*long-chain acyl-CoA synthetase 2*
	RC6G0581400	*GRF1B*
	RC6G0600300	*DCL3*
	RC7G0098100	*GRF8*
	RC7G0327700	*GRF2*

Par exemple, les 10 gènes identifiés comme cibles du miR160 n'ont pas été rapportés dans la littérature. Le miR160 serait impliqué dans la régulation de deux gènes (RC1G0176700 et RC7G0357800, Annexe 7). Ces gènes sont liés à la transduction du signal lumineux provenant du phytochrome A par la lumière rouge sombre (Lin et Wang, 2004).

De même, le miR162a-3p serait capable de réprimer, en plus de *DCL1*, d'autres acteurs impliqués dans la synthèse de petits ARNs. En effet, il ciblerait le gène *KTF1* (*KOW DOMAIN-CONTAINING TRANSCRIPTION FACTOR 1*). La protéine KTF1 est capable d'interagir avec AGO4 et est ainsi impliquée dans la production de siARNs (Rowley et al., 2011). Le miR162a-3p serait également impliqué dans le métabolisme des lipides par la régulation du gène *DELTA5,7-STEROL DELTA7 REDUCTASE* (Ergosterol biosynthesis ERG4/ERG24 family). Ce gène est impliqué dans la synthèse de stérols et entrainerait le phénotype appelé *dwarf5* chez *Arabidopsis*, avec une plante plus petite, portant plus d'inflorescences et des feuilles plutôt rondes et de couleur vert-sombre (Choe et al., 2001). Le miR162a-3p ciblerait aussi un gène codant une Heat Shock protein 70-7 (RC7G0390000). Cette protéine chaperonne serait importée dans les chloroplastes et serait impliquée dans divers processus cellulaires. Une perte de fonction de ce gène entraîne une malformation de feuilles, des cotylédons panachés et un retard de croissance chez *Arabidopsis* (Latijnhouwers et al., 2010).

En plus de ses cibles conservées codant pour des HD-ZIP IIII, le miR166u serait également capable de cibler le gène *HIRA* (Histone Regulator) (RC5G0375400) qui a été démontré comme étant impliqué dans la réorganisation de la chromatine au cours du développement des feuilles chez *Arabidopsis* (Phelps-Durr et al., 2005). Le gène *HIRA* est fortement exprimé dans le méristème et les primordia de jeunes feuilles chez des plantules d'*Arabidopsis*. Le miR166u serait également capable de cibler deux gènes *NIMA* (Never In Mitosis gene A). Ces gènes sont impliqués dans la différentiation et l'élongation cellulaires chez *Arabidopsis* (Motose et al., 2008 ; Motose et al., 2012). Donc, la répression de l'expression de ce miARN par la lumière, pourrait permettre de lever la répression des gènes *NIMA* et contribuer à la reprise de l'élongation et de la différentiation cellulaire lors du débourrement. Le miR166u serait également répresseur du métabolisme des sucres en régulant une alpha amylase, impliquée dans la dégradation de l'amidon (Steup et al., 1983). Ceci est en accord avec l'hypothèse de l'augmentation de la force puit du bourgeon lors du débourrement (Schneider et al., 2019).

Les miARNs 319a_1 et b_1 sont capables de cibler trois gènes *IRON-REGULATED 2* (RC3G0302000, RC3G0302300 et RC6G0050900). Ces gènes sont impliqués dans l'absorption des minéraux (Wintz et al., 2003 ; Schaaf et al., 2006). Il a été montré qu'une limitation de certains minéraux comme le nitrate entraîne un retard du débourrement chez *Arabidopsis*.

Ce couple miR319/*IRON-REGULATED2* pourrait donc jouer un rôle dans le contrôle du débourrement par la régulation de l'absorption de minéraux (de Jong et al., 2014). Ces miARNs pourraient être également impliqués dans le métabolisme des sucres. En effet, ces deux miARNs réprimeraient un gène codant une mannose-6-phosphate isomérase (*M6PI).* Ce gène est impliqué dans la synthèse d'ascorbate et d'acide ascorbique, qui est induit après 24 heures de traitement à l'obscurité (Fujiki et al., 2001 ; Maruta et al., 2008). Dans notre contexte rosier, le miR319b_1 étant réprimé à l'obscurité, et si nous nous appuyons sur ce qui a été publié (Fujiki et al., 2001), nous pourrions envisager que le miR319 b_1 permettrait de lever la répression de *M6PI* et permettre son induction à l'obscurité. Ce gène pourrait donc avoir un rôle inhibiteur du débourrement.

D'autre part, le miR319a_1 pourrait cibler le gène *NO* (*NITRIC OXYDASE*) permettant la synthèse d'oxyde nitrique connu pour interagir avec la signalisation des hormones notamment de l'auxine (Guo et al., 2003 ; Sanchez-Vicente et al., 2021). En particulier, il a été montré récemment que NO est un inducteur du débourrement chez la tomate et interagit négativement avec l'auxine et positivement avec les CK (Yan et al., 2021a). Ceci est concordant avec notre hypothèse du rôle inhibiteur du débourrement du miR319a_1 qui réprime donc *NO.*

MiR319b_1 pourrait jouer un rôle dans l'élongation cellulaire via la répression du gène codant une galacturonosyl transférase (RC2G0586200), impliquée dans la synthèse de pectine, élément important dans la composition de la paroi cellulaire (Qin et al., 2013).

Nous avons montré dans le chapitre I que le métabolisme des lipides pourrait être impliqué dans la régulation du débourrement par la lumière. En lien avec cette observation, un gène impliqué dans ce métabolisme, une *PHOSPHOLIPASE D BETA* 1 (*PDB1*) pourrait être régulée par le miR319b_1. Ce gène a été identifié comme surexprimé à la lumière et à l'obscurité suite à la décapitation (t0). MiR319b_1 étant réprimé à l'obscurité, nous observons bien une corrélation négative d'expression entre ce miARN et ce gène.

Les miARNs 319a_1 et b_1 pourraient donc interagir de manière indirecte avec des acteurs importants dans le contrôle du débourrement comme l'auxine, les cytokinines et les sucres ainsi que de nouveaux acteurs encore non décrits dans le contrôle du débourrement comme les lipides.

Enfin, les deux miARNs matures miR396a-5p et 396b semblent avoir des fonctions similaires car ils ont exactement les mêmes gènes cibles potentiels (Annexe 7). En plus de leurs cibles conservées codant pour des GRF, les miR396 seraient capables également de cibler des gènes impliqués dans le métabolisme de certains acides aminés. En effet, ces miARNs ciblent deux gènes codant des L-cystéine desulfhydrases, qui selon la littérature sont impliquées dans le métabolisme des cystéines (Jin et al., 2011).

Tableau X : **Coefficient de corrélation du nombre de lectures du miARN et de son potentiel gène cible au moment de la décapitation (t0) et 6 heures après décapitation à la lumière (t6L) ou à l'obscurité (t6D).** Le coefficient de corrélation a été calculé par la méthode de Pearson et p-value <0.05.

Couple	t0vst6L	t0vst6D	t6Lvst6D
319b_1 - RC1G131600 (MYB)	**-0.94**	**-0.74**	-
319b_1 - RC2G00521000 (Protein of unknown function)	**-0.88**	**-0.72**	-
319b_1 - RC5G0134300 (TCP2)	-	-	**-0.81**
319b_1 - RC7G0209800 (phospholipase D beta 1)	-	**-0.73**	-
319a_1 - RC1G131600 (MYB)	**-0.92**	-	-
319a_1 - RC1G0509100 (NOS1)	-	**-0.81**	**-0.82**
319a_1 - RC7G0529900 (pectinesterase)	**-0.82**	-	-
396a-5p - RC1G0514100 (COG complex)	-	**-0.94**	-
396a-5p - RC2G0220500 (GRF1A)	**-0.96**	**-0.84**	-
396a-5p - RC2G0499000 (Coatomer)	**-0.84**	**-0.88**	-
396a-5p - RC2G0499400 (Coatomer)	-	**-0.89**	-
396a-5p - RC3G0073200 (Protein of unknown function)	**-0.96**	-	-
396a-5p - RC3G0087500 (genomes uncoupled)	-	**-0.84**	-
396a-5p - RC4G0305600 (L-cysteine desulfhydrase)	-	**-**	**-0.82**
396b - RC1G0062200 (Armadillo)	-	**-0.86**	-
396b - RC1G0392500 (vacuolar protein sorting-associated protein 8)	**-0.86**	**-0.86**	**-**
396b - RC1G0584300 (GRF7)	-	**-0.81**	**-**
396b - RC2G0093200 (cytochrome P450)	-	**-**	**-0.93**
396b - RC2G0362600 (dehydroquinate dehydratase - DHD)	-	**-**	**-0.86**
396b - RC3G0243400 (Zinc Finger)	-	**-**	**-0.81**
396b - RC3G0260300 (Ribonuclease)	-	**-0.86**	**-**
396b - RC4G0468300 (carbonic anhydrase)	-	**-**	**-0.81**
396b - RC5G0556000 (Disease resistance protein)	**-0.82**	**-**	**-**
396b - RC6G0006000 (Disease resistance protein)	-	**-**	**-0.9**
396b - RC6G0009300 (SUI1)	**-0.91**	**-**	**-**
396b - RC7G0058600 (ribonucleoprotein)	**-**	**-0.81**	**-**
396b - RC7G0114600 (DNA binding)	**-0.87**	**-**	**-**
396b - RC7G0115100 (DNA binding)	**-0.98**	**-**	**-**
396b - RC7G0339100 (RHO guanyl)	**-**	**-**	**-0.95**
396b - RC7G0490000 (-)	**-**	**-0.82**	**-**
166u - RC6G0363600 (Subtilase)	**-**	**-**	**-0.91**
162a-3p - RC3G0341900 (unknown function)	**-0.89**	**-**	**-**
162a-3p - RC1G0555600 (notchless protein)	**-**	**-**	**-0.9**

De même, ces miARNs ciblent un gène de type *ALDOLASE_TIM* (RC3G0196800). Cette protéine est impliquée dans la synthèse d'histidine (Noutoshi et al., 2005). De plus, ces miARNs peuvent cibler les gènes *DHD* (*DEHYDROQUINATE DEHYDRATASE*) (RC2G0362600 et RC2G0363300). Les protéines codées par ces gènes sont impliquées dans la synthèse d'acide aminés aromatiques de la voie du shikimate (Singh et Christendat, 2007 ; Tzin et Galili, 2010). Or, nous avons vu lors du chapitre I que le métabolisme de plusieurs acides aminés était régulé à l'obscurité. De même, il a été montré que l'asparagine est impliquée dans le contrôle du débourrement chez le rosier (Le Moigne et al., 2016). Egalement, il a été montré chez une lignée de peuplier *PpEBB1-oe,* surexprimant un FT impliqué dans la réponse à l'éthylène et ayant un phénotype plus ramifié, une augmentation de la quantité des acides aminés acide aspartique (Asp), arginine (Arg), cystéine (Cys), et tryptophane (Trp) (Zhao et al., 2021). Nous pouvons émettre l'hypothèse que d'autres acides aminés pourraient être impliqués dans le contrôle du débourrement sur la base de l'expression des miR396 et de leurs cibles prédites.

Ces deux miARNs, miR396a-5p et miR396b, ciblent également des gènes impliqués dans le processus de la traduction. En effet, ils réguleraient le gène codant la sous unité *Coatomer*. Ce gène est impliqué dans la structure de l'appareil de Golgi (Sanchez-Simarro et al., 2020). De même, un gène codant une protéine ribosomale L6 (RC2G0545700 *RPL6*) et le facteur *SUI* (RC6G0009300) sont ciblés par ces miARNs. Ces deux gènes sont impliqués dans le processus de la traduction (Skabkin et al., 2010 ; Bach-Pages et al., 2020).

En conclusion, de façon intéressante, les sept miARNs matures différentiellement exprimés ont été prédits *in silico* comme capables de cibler des acteurs impliqués dans des voies connues dans le contrôle du débourrement comme la voie de signalisation de l'auxine et des sucres et dans la reprise de l'activité cellulaire. Cette approche met en évidence également de nouvelles voies de régulation non décrites à ce jour comme le métabolisme des lipides et le métabolisme de certains acides aminés comme la cystéine et l'histidine. De plus, certains couples miARNs/gènes codant des facteurs de transcription ont déjà été décrits dans la littérature dans d'autres processus chez d'autres espèces mais leur potentiel rôle n'a pas été étudié dans la régulation du débourrement, ce qui en fait de bons candidats.

Ces modules miARNs/gènes cibles au sein des bourgeons méritent une investigation plus poussée afin de comprendre leurs fonctions biologiques précises au cours du débourrement.

Afin de tester la robustesse de l'existence de ces couples, des liens de corrélation négative entre l'expression de miARN et celles de leurs cibles ont été recherchées. Pour cela, le nombre de lectures associées aux miARNs différentiellement exprimés a été comparé au nombre de lectures de leur potentiel gène cibles obtenues des séquençages.

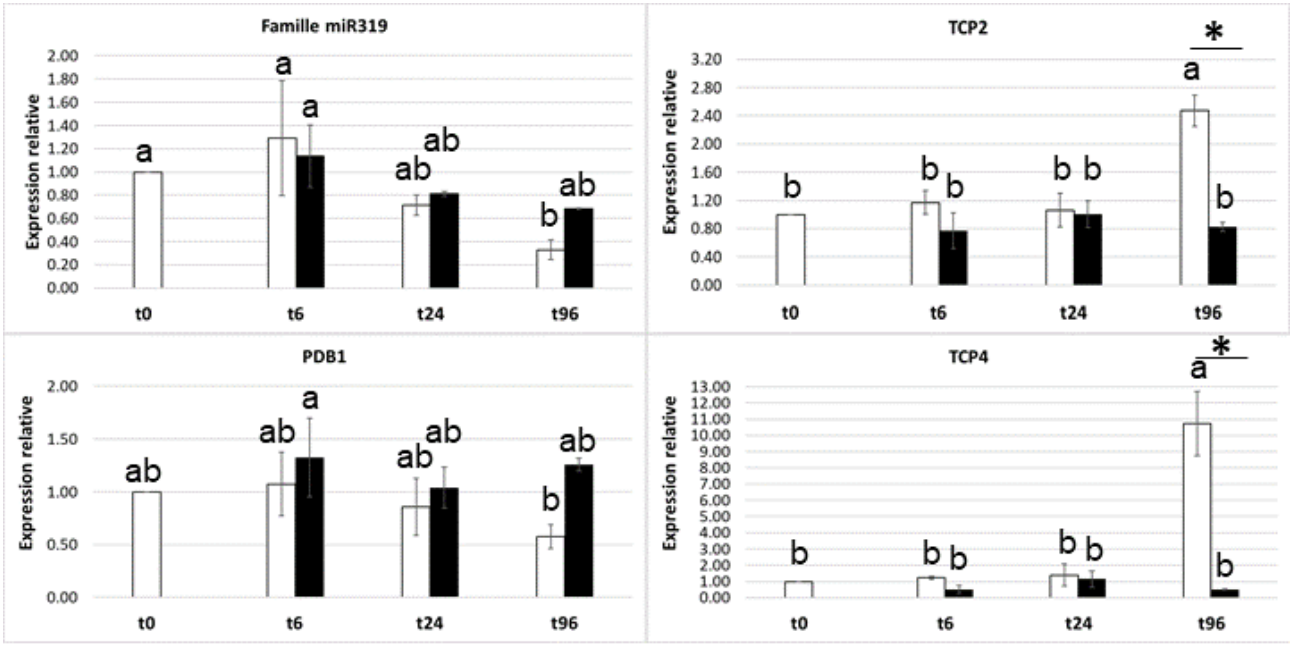

Figure 68 : **Variation de l'expression de la famille miR319 ainsi que de ses potentiels gènes cibles, au cours du processus de débourrement après décapitation.** Evolution de l'expression de la famille miR319, et des gènes *TCP2*, *TCP4* et *PBD1* dans les bourgeons B3 de rosier juste après la décapitation (t0) puis 6h, 24h et 96h plus tard (t+) en condition lumière (barre blanche) ou obscurité (barre noire). Les données issues de trois répétitions biologiques indépendantes représentent les expressions relatives moyennes des transcrits ± l'erreur standard en référence à la condition t0. Les astérisques représentent les différences significatives ($p \leq 0.05$).

Nous avons recherché des corrélations négatives dans nos trois comparaisons : t0vst6L, t0vst6D et t6L vs t6D. Nous avons identifié 33 couples miARNs/gènes cibles présentant une corrélation négative significative au moins une comparaison (Tableau X).

Nous pouvons tout d'abord noter que l'expression de chacun des 7 miARNs matures différentiellement exprimés est corrélée négativement à celle d'au moins un de ces gènes cibles. Nous pouvons en effet remarquer que l'expression de miR396a-5p qui est significativement induit dans les comparaisons t0vst6L et t0vst6D corrèle négativement avec l'expression des gènes *GRF1A* (RC2G0220500) et *Coatomer* (RC2G0499000). Il en est de même pour le miR396b, significativement réprimé à la lumière et à l'obscurité 6 heures après décapitation, pour lequel l'expression est corrélée négativement à celle de son gène cible codant une protéine vacuolaire, dont la fonction n'est pas connue (RC1G0392500).

De la même manière, une corrélation négative entre l'expression de miR319b_1 et celle de son gène cible *PDB1* est observée à l'obscurité. De façon intéressante, nous retrouvons également une corrélation négative d'expression entre miR319b_1 et *TCP2*, une de ses cibles connues dans la littérature.

Nous n'observons aucune corrélation entre miR160 et ses gènes cibles prédits. Plusieurs hypothèses peuvent être émises concernant ce résultat. Ce miARN pourrait réduire le niveau de transcrits de ces gènes plus tardivement au cours du débourrement, et ainsi ne pas être observable à 6 heures après décapitation. La seconde hypothèse serait que ces gènes sont soumis également à d'autres régulations qui masquent la corrélation entre le miARN et ses potentielles cibles.

Egalement, sur 10 gènes prédits comme ciblés par le miR166u, nous identifions sur la base de notre analyse de corrélation un seul gène dont l'expression est corrélée négativement avec le miR166u dans la comparaison t6L vs t6D, un gène codant une protéine appartenant à la famille des peptidases (RC6G0363600) dont la fonction n'est pas clairement définie.

Enfin, deux gènes sont corrélés négativement avec le miR162a-3p. Il s'agit des gènes RC3G0341900 (Protein of unknown function) et RC1G0555600 (Uncharacterized protein) dont les fonctions ne sont pas connues, corrélés à l'expression de ce miARN respectivement dans les comparaisons t0 vs t6L et t6L vs t6D.

Dans la suite de ce travail, nous avons décidé de poursuivre nos investigations sur certains de ces couples démontrant une corrélation négative d'expression par les lectures du séquençage, afin de vérifier si nous retrouvons cette corrélation sur une cinétique plus longue. Notre choix s'est porté sur deux familles, miR319 et miR396.

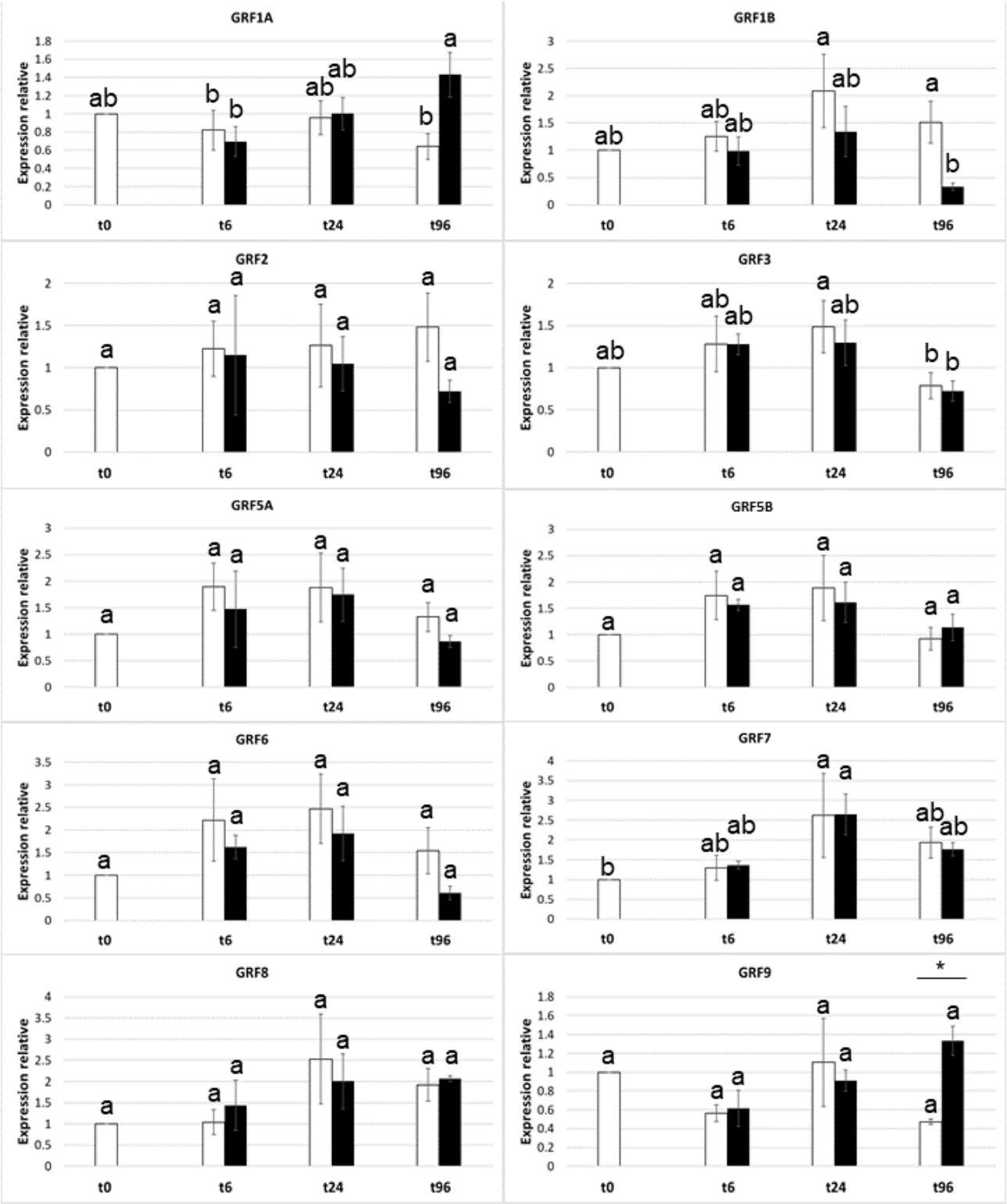

Figure 69 : **Variation de l'expression des GRFs potentiellement ciblés par la famille miR396 chez le rosier, au cours du processus de débourrement après décapitation.** Évolution de l'expression des famille GRFs dans les bourgeons B3 de rosier juste après la décapitation (t0) puis 6h, 24h et 96h plus tard (t+) en condition lumière (barre blanche) ou obscurité (barre noire). Les données issues de trois répétitions biologiques indépendantes représentent les expressions relatives moyennes des transcrits ± l'erreur standard en référence à la condition t0. Les astérisques représentent les différences significatives ($p \leq 0.05$).

Nous avons ainsi suivi l'expression de la famille miR319 avec celle du gène *PDB1* pour son rôle dans le métabolisme lipidique, potentiellement impliqué dans le débourrement. Nous avons aussi suivi l'expression des facteurs de transcription *TCP2* et *TCP4*, cibles connues de ce miARN. Nous avons également étudié la famille miR396 et les gènes *SUI1* et *DHD* pour leurs rôles respectifs dans le contrôle de la traduction et dans le métabolisme d'acides aminés aromatiques (voie du shikimate) ainsi que la famille de gènes cibles connues de cette famille, les *GRFs*.

Pour le miR319, nous avions déjà noté (Figure 68) que la famille miR319 est significativement réprimée à la lumière 96 heures après décapitation (environ 2.85 fois moins exprimé). Nous pouvons remarquer que deux de ses gènes cibles, *TCP2* et *TCP4*, sont eux induits à la lumière 96 heures après décapitation à la lumière (2.4 et 10.5 fois plus exprimés respectivement). Ce résultat vient réaffirmer l'existence d'une corrélation d'expression négative entre le miR319 et ces deux *TCPs*. A l'inverse, le gène *PDB1* n'apparaît pas différentiellement exprimé au cours de la cinétique de débourrement et son expression n'apparaît pas corrélée négativement avec celle de miR319 (Figure 68).

Concernant la famille miR396, le miR396a-5p est surexprimé 6 heures après décapitation alors que miR396b est réprimé selon nos résultats de séquençage. Pour les gènes *GRFs* cibles connues des miR396, nous pouvons observer que le gène *RhGRF7* est induit à 24 heures après décapitation à la lumière et à l'obscurité (Figure 69). En revanche, le gène *RhGRF9* est réprimé à l'obscurité 96 heures après décapitation par rapport à la lumière. Compte tenu des résultats, il apparaît difficile d'avoir une réponse claire de l'évolution de la famille *GRF* au cours du débourrement. Aucune corrélation entre l'expression de la famille miR396 et celle des *GRF* au cours de débourrement n'est observée dans nos résultats de qPCR (Figure 69). Cela vient appuyer l'hypothèse que comme les miR396a-5p et 396b ont un profil d'expression inverse, le profil d'expression de la famille miR396 est "écrasé". Cependant, sachant que le miR396b est réprimé à la lumière et à l'obscurité 6 heures après décapitation (selon nos résultats de séquençage) et que le gène *RhGRF7* est induit à 24 heures après décapitation à la lumière et à l'obscurité, nous ne pouvons pas écarter la possibilité que ce miARN et le gène *RhGRF7* sont corrélés négativement.

En revanche, nous n'observons pas de corrélation d'expression inverse entre la famille miR396 et les gènes *DHD* et *SUI1* (Figure 70).

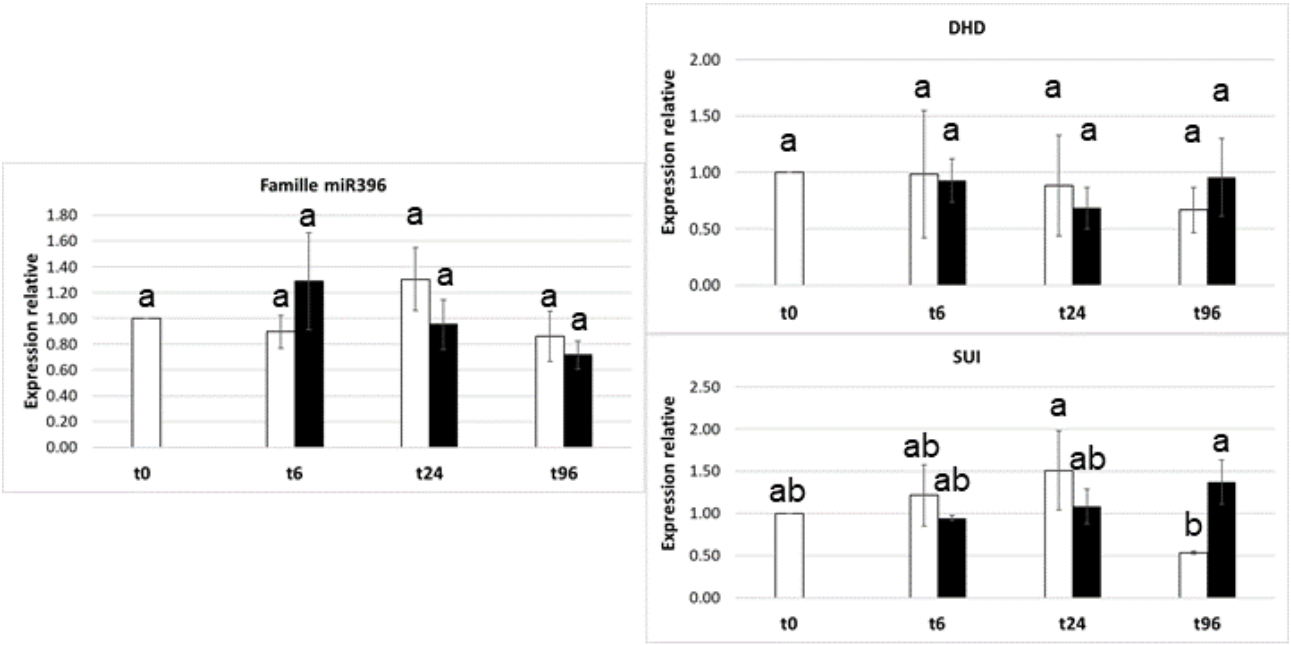

Figure 70 : **Variation de l'expression de la famille miR396 ainsi que ses potentiels gènes cibles, au cours du processus de débourrement après décapitation.** Evolution de l'expression de la famille miR396 et des potentiels gènes cibles encore non rapporté dans la littérature dans les bourgeons B3 de rosier juste après la décapitation (t0) puis 6h, 24h et 96h plus tard (t+) en condition lumière (barre blanche) ou obscurité (barre noire). Les données issues de trois répétitions biologiques indépendantes représentent les expressions relatives moyennes des transcrits ± l'erreur standard en référence à la condition t0. Les astérisques représentent les différences significatives ($p \leq 0.05$).

3. Discussion et conclusion

Ce chapitre avait pour but d'étudier l'évolution du micro-transcriptome du bourgeon axillaire de rosier, au temps 6 heures après décapitation et en fonction des conditions de lumière. Nous avons pu dans un premier temps identifier 2358 siARNs et 270 miARNs (nouveaux et conservés) exprimés dans le bourgeon 3 de rosier dans au moins une de nos 3 conditions.

Dans un deuxième temps, nous avons pu observer qu'un nombre important de siARNs étaient différentiellement exprimés dans nos conditions en comparaison du faible nombre de miARNs. Les 7 miARNs différentiellement exprimés identifiés appartiennent à des familles distinctes de miARNs, toutes conservées chez les végétaux. Certains comme les miR396a-5p et miR396b répondent clairement à un effet décapitation et non à un effet de la lumière tandis que d'autres sont spécifiquement induits ou réprimés uniquement à la lumière ou à l'obscurité. Le miR166 est ainsi réprimé en réponse à la lumière et à la décapitation. Les miR319a_1 et 319b_1 sont induits et réprimés à l'obscurité, 6 heures après décapitation, respectivement. Le miR162a-3p est induit à l'obscurité, par rapport à la condition lumière, 6 heures après décapitation.

Nous avons voulu suivre l'expression de ces 7 miARNs par stem-loop qPCR, mais les amorces dessinées pour cette étude présentent une forte similarité de séquences avec l'ensemble ou partie des autres membres de la famille du miARN d'intérêt. De plus, aucune différence significative d'expression des familles suivies à l'exception de la famille miR160 n'a pu être observée. Cela pourrait s'expliquer par le fait que chacun des membres d'une famille de miARN ont un profil d'expression différent, étant par exemple exprimés dans des tissus différents, et donc pourraient avoir un rôle différent. En effet, il a été montré récemment que différents membres de la famille miR172 pouvaient jouer un rôle dans différents processus dans la régulation du développement chez *Arabidopsis thaliana* (Ó'Maoiléidigh et al., 2021).

Les miARNs matures sont générés à partir de familles de gènes *MIR*. Il existe cependant peu de données sur le rôle individuel de chacun de ces gènes appartenant à une même famille MIR (Ó'Maoiléidigh et al., 2021). De même, nous savons peu de choses sur les spécificités de profils d'expression spatio-temporels des différents membres d'une même famille de miARNs. Sont-ils régulés par différents stimuli environnementaux, ce qui pourrait de ce fait impacter divers processus développementaux ? De plus nous pouvons nous demander si différents membres d'une même famille de miARNs agissent sur des mêmes cibles ou bien des cibles différentes ? Ces questions restent encore à élucider (Zhang et Chen, 2021).

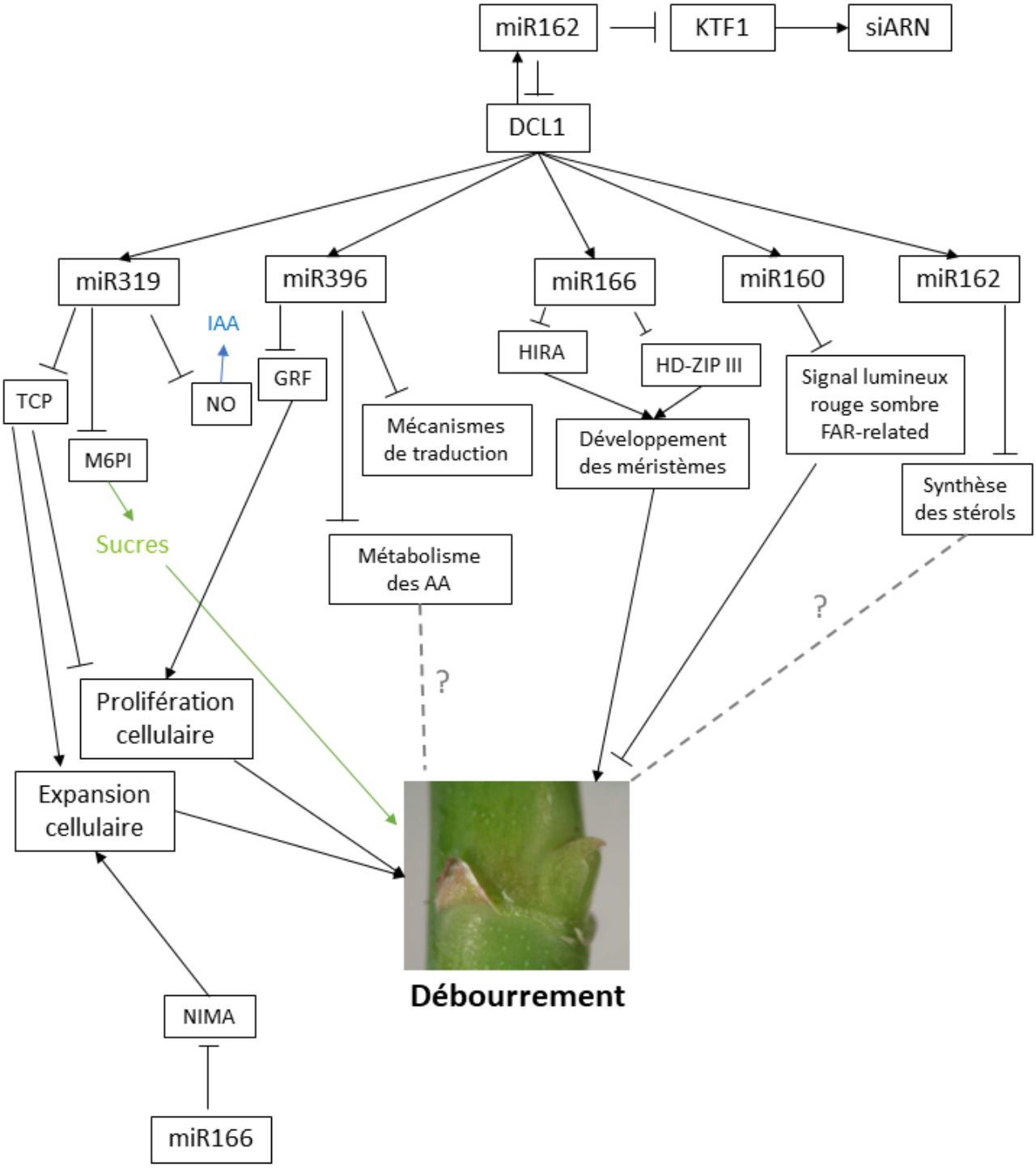

Figure 71 : **Potentiels rôles des miARNs dans le contrôle du débourrement selon nos résultats de séquençage chez le rosier.** En gris pointillé, rôle encore non connu dans le contrôle du débourrement. Les flèches représentent une induction, les lignes droites représentent une répression.

Enfin, dans un troisième temps, la prédiction de gènes cibles des miARNs différentiellement exprimés, et l'analyse de corrélation des expressions de ces gènes cibles avec celles des miARNs nous a permis d'identifier 33 couples miARN/gène cible avec des variations d'expression opposées (Tableau X). Nous avons pu également confirmer la fonction potentielle de ces miARNs en retrouvant bien des gènes cibles déjà décrits dans la littérature dont principalement des facteurs de transcription connus comme les *HD-ZIP III* pour le miR166u, les *TCPs* pour les miR319 ou les *GRFs* pour les miR396.

A partir de nos résultats et ceux de la littérature, nous pouvons proposer un modèle de la régulation du débourrement par des miARNs (Figure 68). Le miR162 se situe en amont de notre modèle car ce miARN aurait un rôle plus général dans le contrôle du débourrement. En effet, le miR162a-3p joue un rôle dans l'homéostasie des miARNs et siARNs en réprimant les gènes *DCL1* et *KTF1*. Il pourrait donc potentiellement réguler d'autres miARNs et siARNs qui en retour contrôleraient le débourrement. Notamment, la famille miR319 pourrait réguler l'expansion cellulaire ou le métabolisme des sucres, par la répression des gènes *TCPs* et *M6PI* respectivement. Également, la famille miR396 régulerait l'expansion cellulaire et ciblerait également des mécanismes de traduction. De plus, le miR166 serait régulateur du développement des méristèmes ainsi que l'élongation cellulaire par la répression des gènes *HD-ZIP III*, NIMA et *HIRA.* Et enfin, le miR160 aurait un rôle dans la transduction du signal lumineux rouge sombre par la régulation des gènes *FAR1-RELATED* (Figure 71).

Nous avons également identifié quelques nouvelles voies pouvant être ciblées par ces miARNs dont par exemple le miR319 qui pourrait cibler le gène *PDB1* impliqué dans le métabolisme des lipides, ou le miR396 pouvant cibler des gènes impliqués dans le métabolisme de certains acides aminés.

Comme décrit en introduction, un miARN via le complexe RISC va soit entraîner la dégradation de l'ARNm cible soit entraîner l'inhibition de la traduction. Concernant les 33 couples présentant une corrélation négative d'expression, nous pouvons nous attendre que le miARN entraîne une dégradation de l'ARNm. Cependant, les 126 gènes restants pouvant être ciblés par les miARNs DE dans notre séquençage, mais ne présentant pas de corrélation négative, restent cependant des candidats intéressants dans l'étude du contrôle du débourrement, les miARNs les ciblant pouvant potentiellement induire une inhibition de leur traduction ou bien d'autres régulations du gène cible pourraient masquer l'effet du miARN.

Enfin, l'analyse d'expression sur une cinétique plus longue nous a permis de confirmer la corrélation négative d'expression de certains de ces couples. C'est le cas des couples miR319/*TCP2* et miR319/*TCP4*.

De plus, les données de la littérature décrivant miR319 comme réprimé dans des bourgeons en débourrement chez la canne à sucre (Ortiz-Morea et al., 2013) sont en concordance avec nos résultats. MiR319a_1 est en effet surexprimé à l'obscurité, 6 heures après décapitation (Figure 64). Cela signifierait que ce miARN est inhibiteur du débourrement, ce qui est en accord avec les résultats obtenus chez la canne à sucre (Ortiz-Morea et al., 2013).

L'analyse du séquençage montre que les miR396 présentent une corrélation négative avec leurs gènes cibles connus, des *GRFs*. Bien que nous n'ayons pu confirmer ces résultats par qPCR, le couple miR396/*GRF* reste un couple intéressant à étudier davantage car ce couple participe chez *Arabidopsis* au contrôle du développement foliaire et de la prolifération cellulaire, deux processus importants du débourrement (Schommer et al., 2014).

Il reste à déterminer si ces nouveaux couples d'intérêt miARN/gènes interagissent physiquement et démontrent une pertinence biologique dans la régulation du débourrement des bourgeons et de son photo-contrôle. A cette fin, nous devons aller vers l'analyse fonctionnelle et l'utilisation de mutants. C'est ce que nous étudierons dans le chapitre suivant avec quelques couples que nous avons identifiés.

Chapitre IV : Validation fonctionnelle de deux couples miARN / gène cible de rosier dans le contrôle du débourrement.

1. Introduction

Nous avons identifié dans le chapitre précédent, 33 couples miARN/gène cible (Tableau X) présentant une corrélation d'expression négative et suggérant donc un contrôle négatif entre le miARN et le gène candidat ciblé. Ces couples étant nombreux, nous nous sommes focalisés sur l'étude de deux de ces couples : miR319/*TCP* et miR396/*GRF* qui, selon la littérature, présentent un rôle potentiel dans le contrôle du débourrement.

Nous avons montré que l'expression des gènes *RhTCP2* et *TCP4* était induite en fin de cinétique de débourrement au point 96h à la lumière (2.4 et 11 fois plus exprimés respectivement, Chapitre III Partie 2.6.), et que l'induction de l'expression de ces gènes était corrélée négativement avec la baisse de l'expression du miR319 (environ 3 fois moins exprimés à 96h). L'accumulation forte de transcrits des gènes *TCP2* et *TCP4* dans les bourgeons de rosier juste avant son débourrement pourrait être corrélée à l'organogenèse foliaire qui prend place dans le bourgeon axillaire de rosier dès la décapitation de la tige et qui se traduit par la protrusion d'une feuille à limbe différencié 96h plus tard (Girault et al., 2008). Plusieurs observations suggèrent un lien entre miR319/TCP et la ramification. Notamment, il a été montré que le miR319 (miRJAW), via la régulation de *TCPs*, a un rôle dans la morphogénèse des feuilles chez *Arabidopsis thaliana* (Palatnik et al., 2003). Plus précisément, les gènes *TCPs* régulent la croissance de la feuille et ont des effets particulièrement nets sur le développement de la marge des feuilles chez Arabidopsis (Koyama et al., 2010). Par ailleurs, il a été montré chez *Arabidopsis* que AthTCP4 peut activer la transcription du gène *YUCCA5*, un gène de synthèse de l'auxine (Challa et al., 2016), une hormone importante dans le contrôle du débourrement. De plus, la protéine TCP2 d'*Arabidopsis* est sous photo-contrôle et est capable de réguler positivement *HY5*, impliqué dans la transduction du signal lumineux. La lumière bleue permet l'augmentation du nombre de transcrits de *TCP2* (He et al., 2016). De plus, il a été montré un nombre réduit d'axes chez une lignée exprimant une version résistante au miR319 chez *Arabidopsis*, mTCP24 (Wang et al., 2015a).

Le miR319 étant capable de cibler chez *Arabidopsis* 5 gènes *TCPs* parmi lesquels *TCP2* et *TCP4*, le miR319 et ces *TCPs* forment donc des couples intéressants dans l'étude du contrôle du débourrement et son photo-contrôle. Sur la base de l'expression du *miR319* et des *TCPs* chez le rosier (la famille miR319 est réprimée à 96 heures après décapitation à la lumière alors que les *TCP2* et *4* sont surexprimés) et de selon la littérature, nous pouvons émettre l'hypothèse que le miR319 serait plutôt répresseur du débourrement par l'inhibition de l'expansion cellulaire et le développement des jeunes feuilles par la répression des *TCPs*.

Nous avons montré également que le miR396a-5p mature est surexprimé 6 heures après décapitation à la lumière et à l'obscurité alors que le miR396b est réprimé. De même, nous avons pu noter une corrélation d'expression négative du miR396a-5p avec un de ses gènes cibles *GRF1A* (RC2G0220500) dans les comparaisons t0 vs t6L et t0 vs t6D. Cela suggère que le couple miR396a-5p/*GRF* a un profil d'expression indépendant de la condition d'éclairement et serait donc impliqué dans la réponse à la décapitation chez le rosier.

Chez *Arabidopsis*, les miARNs matures 396 sont codés par les gènes *MIR396a* et *b* (AT2G10606 et AT5G35407). La surexpression du *miR396* a un impact négatif sur la prolifération cellulaire dans les feuilles et les méristèmes et le développement des feuilles par la répression des *GRFs* (*GROWTH REGULATING FACTORS*) (Kim et al., 2003 ; Liu et al., 2009 ; Rodriguez et al., 2010 ; Omidbakhshfard et al., 2015). De plus, le triple mutant *grf1grf2grf3* entraîne la réduction de la taille des feuilles et des cotylédons par rapport à la plante sauvage, associé à une diminution de la taille des cellules (Kim et al., 2003). De même pour la perte de fonction *grf5* qui entraîne la production de feuilles plus étroites et une diminution du nombre de cellules alors que sa surexpression entraîne la prolifération des cellules et induit une augmentation de la taille des feuilles (Horigushi et al., 2005). De plus, il a été montré récemment que *GRF5* chez le peuplier régule négativement un gène impliqué dans la dégradation des cytokinines, *CKX1* et régule l'expansion et la division cellulaire dans les feuilles (Wu et al., 2021).

Outre le rôle bien établi des GRFs dans le développement foliaire, il a été montré que la surexpression du gène *GRF1* entraîne une élongation des tiges chez le riz. De plus, il est induit chez le riz par les gibbérellines et par la submersion des tiges dans l'eau (van der Knaap et al., 2000). Les gibbérellines (GA) sont des hormones impliquées dans la croissance de nombreux organes et ont un rôle dans le contrôle du débourrement (Choubane et al., 2012). L'ensemble de ces observations indiquent que le module miR396-*GRF* et les GA pourrait être intéressant à étudier dans le cadre du contrôle du débourrement.

Il semblerait donc qu'il pourrait y avoir un réseau de régulation entre le miR396, les *GRFs* avec des hormones impliquées dans le contrôle du débourrement (GA et CK), ce qui fait du couple miR396/*GRF*, un couple intéressant à étudier. MiR396 en réprimant l'expression des *GRFs*, entraînerait une répression de la prolifération cellulaire et donc du débourrement du bourgeon.

Notre recherche de gènes cibles a été faite par prédiction *in silico.* Il est important ensuite de déterminer le rôle *in planta* du module miARN/gène cible. Le rosier étant récalcitrant aux transformations (Hammama et al., 2019), nous avons étudié l'effet de la surexpression de pre-miARN de rosier chez *Arabidopsis thaliana*. Pour cela, des plantes d'*Arabidopsis thaliana* ont été transformées avec des constructions géniques contenant les séquences des pre-miR319 et 396.

Tableau XI : Récapitulatif des pre-miARNs et miARNs matures étudiés.

Nom du miARN mature étudié	**Numéro d'accession du gène codant le pre-miARN sur le génome de *Rosa chinensis* dont provient le miARN**	**Nom donné au pre-miARN**
miR319a_1	RC7G0175600	pre-miR319a_1_1
	RC5G0635700	pre-miR319a_1_2
miR319b_1	RC1G0499800	pre-miR319b_1
miR396a-5p	RC2G0032700	pre-miR396a-5p
miR396b	RC2G0032500	pre-miR396b

Les conséquences de la surexpression de pre-miARNs de rosier sur le phénotype d'*Arabidopsis* ont été étudiées

Les lignées transgéniques des pre-miARNs de rosier que nous avons produit ont été comparées à différentes lignées transgéniques des miARNs ou de gènes cibles d'intérêt d'*Arabidopsis* fournies gracieusement par J. Palatnik (Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire de Rosario en Argentine). Nous avons ainsi comparé les phénotypes de nos lignées avec le phénotype des lignées *jawD* (sur exprimant miR319a, Palatnik et al., 2003) et *35S:miR396b* (Rodriguez et al., 2010) qui sont des sur-expresseurs des miR319a et 396b d'*Arabidopsis* respectivement. D'autres lignées ont été utilisées : la lignée *soj8* (Rodriguez et al., 2010) porte une mutation au niveau du site de fixation de miR319 du gène *AthTCP4* endogène, la rendant moins sensible à l'action du miARN et donc augmente l'accumulation de transcrit du gène cible, *MIM396* surexprime, elle, une construction "mimicry" piégeant et inactivant partiellement le miR396 (Debernardi et al., 2012), quant à *rGRF2* (Rodriguez et al., 2010), cette lignée transgénique porte le gène *GRF2* résistant au miR396, le site de fixation du miR396 étant muté.

L'effet de la surexpression des pre-miARNs de rosier (pre-miR319a_1, pre-miR319b_1 et pre-miR396a-5p) sur la capacité de méristèmes axillaires et sur la transition florale ainsi que sur le développement des feuilles de rosettes ont particulièrement été étudiés.

Chez *Arabidopsis*, pendant la phase végétative, le MAC produit des feuilles de rosette, à l'aisselle desquelles se développe en général un méristème axillaire qui donnera par la suite un paraclade de rosette. Après la transition florale (montaison), le MAC produit des feuilles caulinaires portant des paraclades secondaires puis plus tard, des fleurs, et après fécondation, les fleurs forment des siliques contenant les graines.

Nous avons suivi l'effet de la surexpression de pre-miARN de rosier sur la transition entre la phase végétative et la phase reproductrice en notant le jour de montaison, qui est le jour de transition florale (Matériel et Méthode, Partie 6.2). La transition florale permet de lever la répression de l'apex sur les bourgeons axillaires, permettant la production de nouveaux axes (exemple de dominance apicale ; Bennet et Leyser, 2006).

Puis nous avons étudié l'effet de la surexpression des pre-miARNs de rosier sur le développement des bourgeons. Pour cela, nous avons calculé le ratio entre le nombre de paraclades de rosette sur le nombre de feuilles de rosette (ratio PR/FR) traduisant ainsi le développement des méristèmes axillaires en axes. Nous avons également calculé le ratio nombre de paraclades caulinaires secondaires sur le nombre de feuilles caulinaires (ratio PC/FC) afin d'étudier le développement de méristèmes d'inflorescence en axes inflorescenciels (Matériel et Méthode, Partie 6.2).

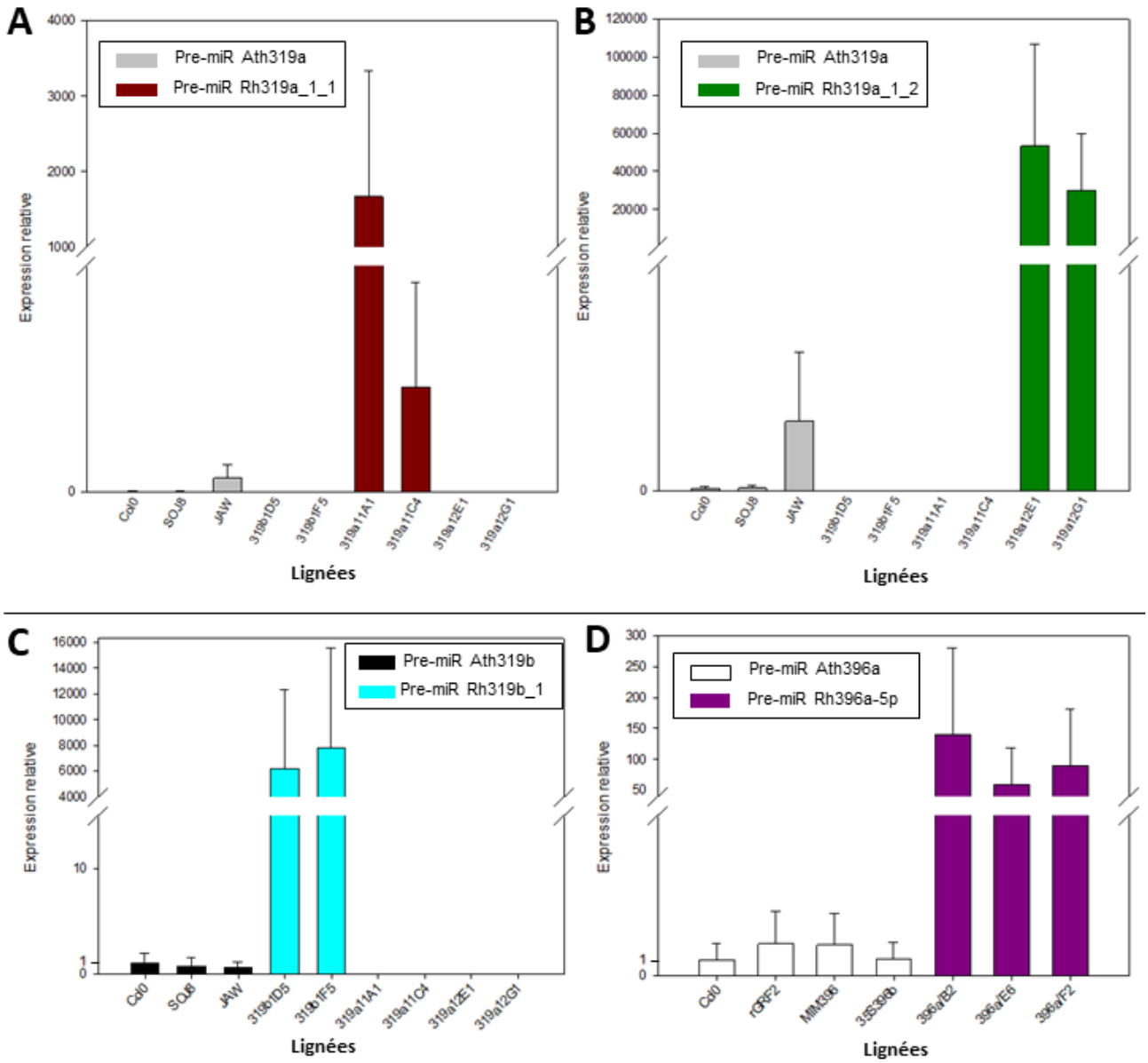

Figure 72 : **Accumulation de transcrits des constructions pre-miR319a_1_1, pre-miR319a_1_2, pre-miR319b_1 et pre-miR396a-5p dans les lignées transgéniques d'*Arabidopsis*.** A : Expression du pre-miR319a_1_1 de rosier et du pre-miR319a d'*Arabidopsis*. B : Expression du pre-miR319a_1_2 et du pre-miR319a d'*Arabidopsis*. C : Expression du pre-miR319b_1 de rosier et du pre-miR319b d'*Arabidopsis*. D : Expression du pre-miR396a-5p de rosier et du pre-miR396a d'*Arabidopsis*. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard. Nous avons comparé l'accumulation de transcrits (Ct) de nos pre-miRs de rosier dans nos lignées relative à l'accumulation de transcrits du gène de référence ubiquitine UBI chez *Arabidopsis* (ce qui nous permet d'obtenir un ΔCt), le tout par rapport à l'accumulation de transcrit de pre-miARN d'*Arabidopsis* dans la lignée sauvage relatif à l'accumulation de transcrits de UBI (ce qui nous permet d'avoir un ΔΔCt). L'accumulation de transcrits des pre-miARNs de rosier est rapportée à l'accumulation du pre-miARN *Arabidopsis* chez la lignée sauvage (considéré comme "condition contrôle").

2. Résultats

2.1. Validation de l'accumulation des pre-miARNs chez les lignées transgéniques

Chez le rosier, le miR319a_1 mature est généré à partir de deux précurseurs (pre-miRs) que nous appelons 319a_1_1 et 319a_1_2. Le miR319b_1 est lui généré à partir d'un unique pre-miARN, appelé pre-miR319b_1 (Tableau XI). Nous avons produit des constructions plasmidiques de chacun de ces pre-miRs associés à un double-promoteur 35S. Ces constructions ont ensuite été utilisées pour transformer des plantes d'*Arabidopsis*.

Les miARNs matures, miR396a-5p et miR396b, sont chacun générés par un unique pre-miARN, pre-miR396a-5p et pre-miR396b respectivement. Il est important de noter que seule la construction surexprimant le pre-miR396a-5p a pu être obtenue. Nous allons nous intéresser uniquement au miR396a-5p pour la suite de ce chapitre concernant ces miR396.

Pour chacun des précurseurs étudiés, deux lignées indépendantes, homozygotes en T3 ont été choisies pour le suivi phénotypique. Les lignées (35S::319a_1_1, 35S::319a_1_2, 35S::319b_1, 35S::396a-5p), la lignée sauvage Col0 ainsi que les lignées (soj8, *jawD*, rGRF2, MIM396 et 35S396b) ont été cultivées en serre en jour long (16h jour et 8h nuit). Le phénotype a été suivi à partir du jour de montaison jusqu'au stade de croissance tardif (silique mature), juste avant ensachage des plantes pour récolte de graines.

Afin de valider que nos lignées sont bien transformées, nous avons vérifié l'accumulation de transcrits des différents pre-miARNs dans ces lignées.

Tout d'abord, nous observons que les pre-miARNs rosier 319a_1_1 ont une forte quantité de transcrits dans les deux lignées 35S::319a_1_1 A1 et C4 (1667 et 231 fois respectivement) en comparaison à la quantité de transcrits de pre-miR319a d'*Arabidopsis* chez la plante sauvage, Figure 72 A). Également, les transcrits du pre-miR319a_1_2 sont fortement accumulés dans les lignées 35S:/319a_1_2 (53262 et 29943 fois plus accumulés que le pre-miR319a d'*Arabidopsis* chez la lignée sauvage pour les lignées E1 et G1 respectivement, Figure 72 B). Enfin, les transcrits pre-miR319b_1 sont fortement accumulés dans les lignées 35S::319b_1 (6167 et 7778 fois plus de transcrits que le pre-miR319a d'*Arabidopsis* chez la lignée sauvage pour les lignées D5 et F5) (Figure 72 C).

Nous notons également l'expression du *pre-miR319a* d'*Arabidopsis* chez la lignée surexprimant *jawD* qui est environ 30 fois plus exprimée que dans la lignée sauvage Col0 (Figure 72 A).

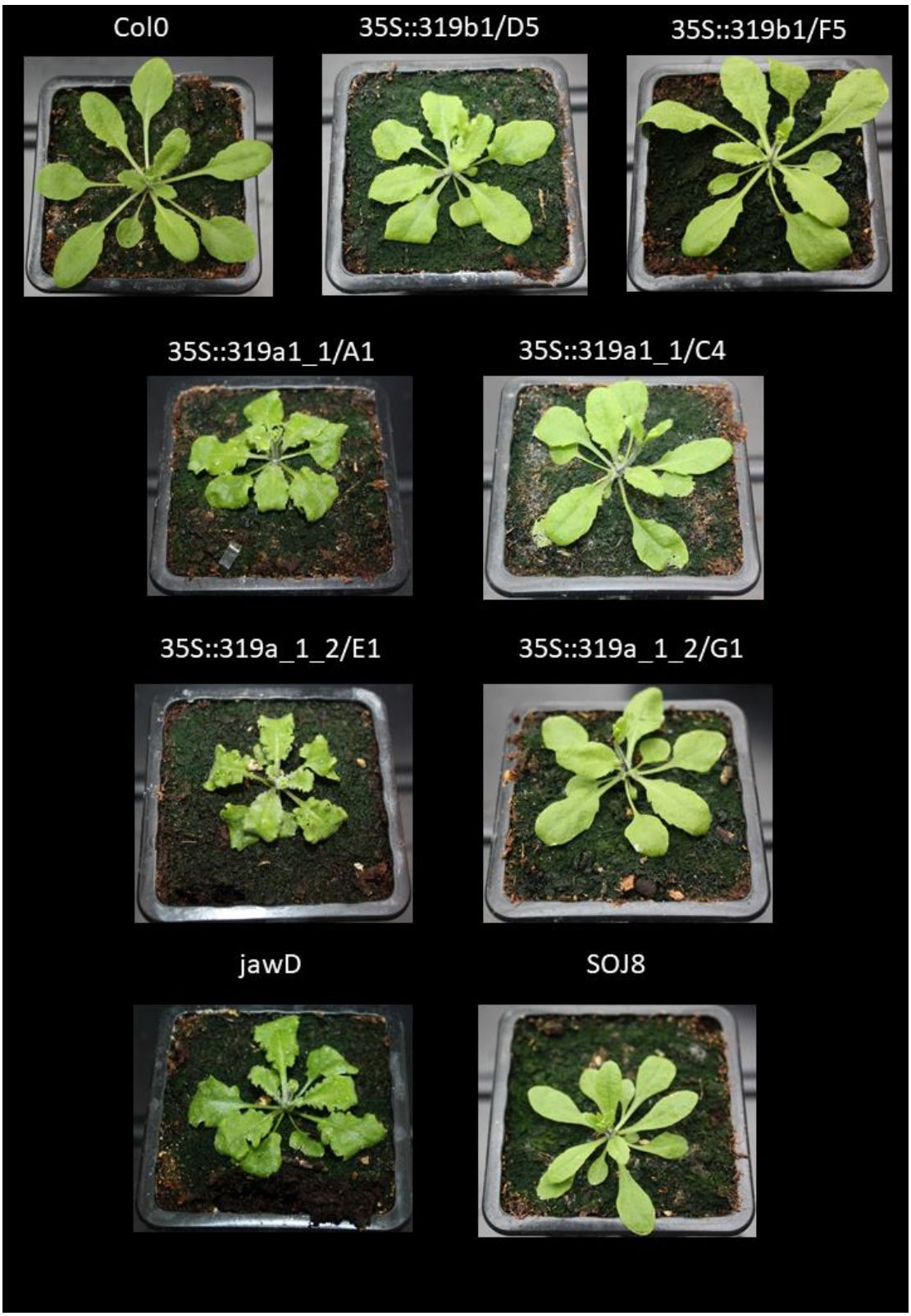

Figure 73 : L**ignées transgéniques d'*Arabidopsis* portant les séquences des pre-miARN de rosier sous contrôle du promoteur 35S (35S::319a_1_1/A1, 35S::319a_1_1/C4, 35S::319a_1_2/E1, 35S::319a_1_2/G1, 35S::319b_1/D5, 35S::319b_1/F5), et lignées d'*Arabidopsis jawD*, *SOJ8* et sauvage *Col0* prises le jour de la montaison.** Photo : Julie Mallet.

Nous pouvons noter que les transcrits des pre-miR319 de rosier dans nos lignées transgéniques sont beaucoup plus fortement accumulés que le pre-miR319a chez la lignée *jawD*. Cela pourrait peut-être s'expliquer par le fait que les constructions pre-miARN rosier sont constituées d'un double promoteur 35S.

Concernant le pre-miR396a-5p, la lignée 35S::396a-5p/B2 présente la plus forte accumulation de transcrits du précurseur (139 fois plus accumulé que le pre-miR396a d'*Arabidopsis* au sein de la lignée sauvage Col0). Les lignées 35S::396a-5p/E6 et 35S::396a-5p/F2 ont elles leur transcrits 58 et 90 fois plus accumulés par rapport au nombre de transcrits du pre-miR Ath396a chez la lignée sauvage Col0 (Figure 72 D).

En conclusion, nous disposons pour notre étude phénotypique de lignées transgéniques présentant une forte accumulation de transcrits des pre-miARNs de rosier 319 et 396.

2.2. Etude du phénotype des lignées transgéniques *Arabidopsis*

Des photographies de plantes représentatives des différentes lignées transgéniques ont été prises au jour de montaison (Figure 73 et 74).

L'observation rapide des lignées 35S::319a_1 montre qu'elles présentent un phénotype similaire à la lignée *jawD* surexprimant le pre-miR319a d'*Arabidopsis*. En effet, celles-ci se caractérisent par des feuilles dentelées et plissées et par un retard de la montaison comme la lignée *jawD* (Figure 73).

Concernant les lignées 35S::396a-5p/B2 et 35S::396a-5p/F2, surexprimant le pre-miR396a-5p de rosier, celles-ci présentent des feuilles plus étroites en forme de "spatule" (Figure 74). Ce phénotype est similaire à celui observé par Liu et al. (2009) chez des lignées surexprimant les *MIR396a* et *MIR396b*.

En conclusion de cette première observation, il semble que les constructions géniques de rosier étudiées ici soient fonctionnelles dans *Arabidopsis*. Nos premières observations phénotypiques suggèrent une conservation de fonctions entre le rosier et *Arabidopsis*. Une analyse phénotypique plus poussée a été menée afin de le vérifier et de déterminer leurs éventuels effets sur la ramification.

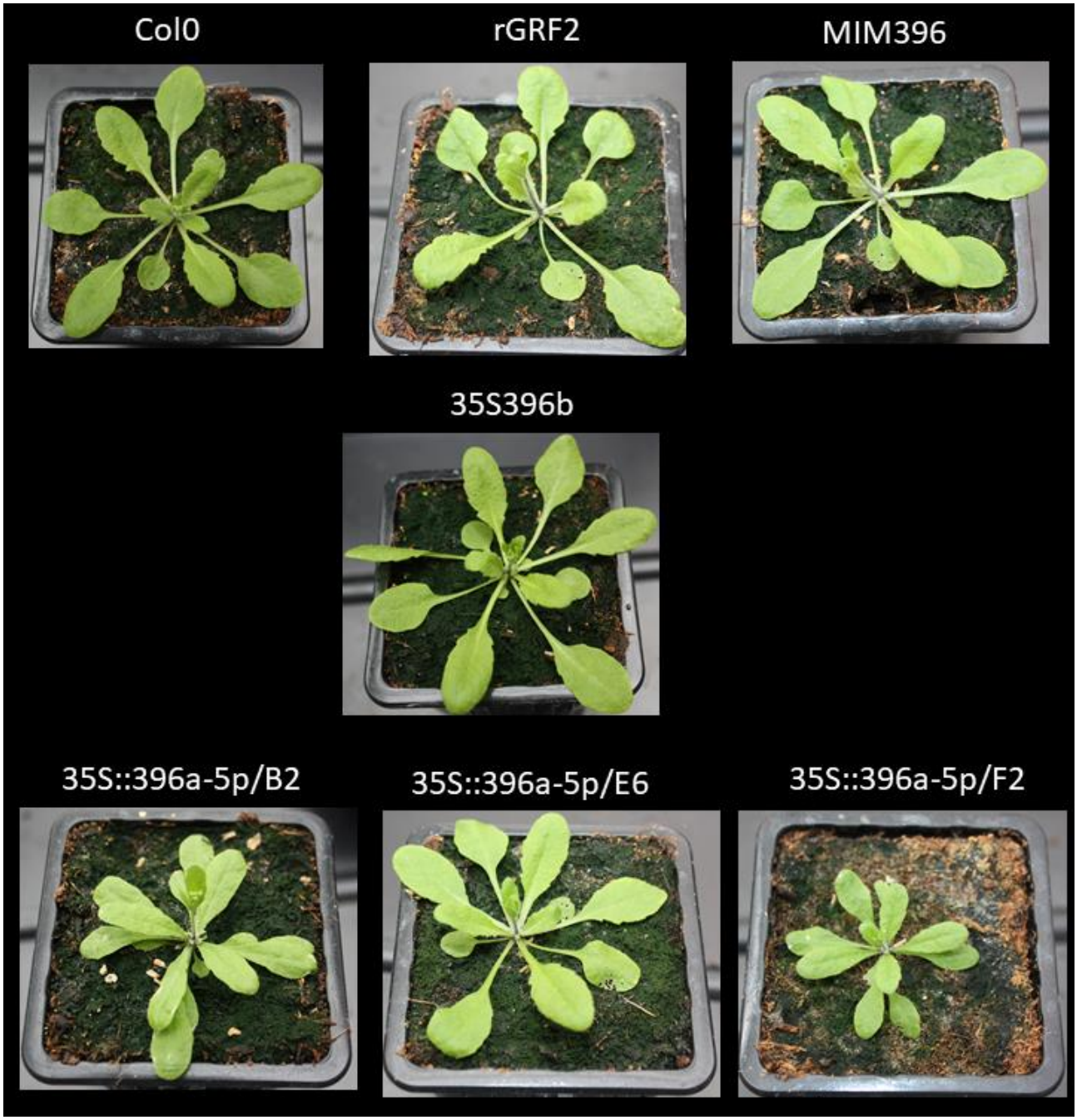

Figure 74 : **Lignées transgéniques d'*Arabidopsis* portant les séquences des pre-miARN de rosier sous contrôle du promoteur 35S (35S::396a-5p/B2, 35S::396a-5p/E6 et 35S::396a-5p/F2), et lignées d'*Arabidopsis rGRF2*, *MIM396*, 35S396b et la lignée sauvage Col0, prises le jour de leur montaison**.

2.2.1. Études des lignées transgéniques, 35S::319a_1_1, 35S::319a_1_2 et 35S::319b_1.

L'observation phénotypique plus fine montre que les lignées surexprimant les pre-miR319a_1 et pre-miR319b_1 présentent un nombre de feuilles de rosettes plus faible que la lignée sauvage (Figure 75 B). En effet, les lignées transgéniques 35S::319a_1 et 35S::319b_1 ont entre 7 et 8 feuilles de rosette alors que la lignée sauvage Col0 en présente 11 en moyenne. La surexpression des pre-miR319a_1 et 319b_1 pourrait donc avoir un effet répresseur sur la formation des feuilles de rosette.

Les lignées transgéniques 35S::319a_1 ont un nombre significativement réduit de paraclades de rosettes par rapport à la lignée sauvage Col0 (4.2, 3.92 et 4.07 paraclades de rosettes chez 35S::319a_1_1/A1, 35S::319a_1_1/C4 et 35S::319a_1_2/E1 respectivement contre 5.27 paraclades de rosette pour la lignée Col0) (Figure 75 C). Néanmoins, si l'on calcule le ratio nombre de paraclades de rosette/nombre de feuilles de rosettes (ratio PR/FR) chez ces plantes, nous n'observons pas de différence significative par rapport aux plantes sauvages (Figure 75 D). Compte tenu de ces observations, nous pouvons émettre l'hypothèse que la surexpression du pre-miR319a_1 de rosier chez *Arabidopsis* n'altère pas le développement des bourgeons à l'aisselle des feuilles de rosettes. De manière intéressante, la diminution du nombre de paraclades de rosette n'est pas observée chez les lignées 35S::319b_1. Cependant, nous pouvons noter que la lignée 35S:319b_1/D5 a un ratio PF/FR plus élevé par rapport à la lignée sauvage Col0.

Un net retard de la montaison chez les lignées surexprimant le pre-miR319a_1 de rosier a aussi été noté : un retard d'environ 2 (lignée 35S::319a_1_1/A1) et 4 jours (35S::319a_1_2/E1) par rapport à la lignée contrôle Col0 (Figure 75 A). Ce retard ne peut être attribué à un développement végétatif plus important chez ces lignées puisqu'elles présentent un nombre de feuilles de rosette plus réduit que la lignée sauvage. Ce phénotype pourrait plutôt traduire un retard de la transition florale du MAC. La surexpression des pre-miR319a de rosier entraînerait donc aussi un retard de floraison chez *Arabidopsis*

Le nombre de paraclades caulinaires se développant sur l'axe inflorescentiel principal a été dénombré. Les lignées 35S::319b_1/D5, 35S::319a_1_1/A1, 35S::319a_1_1/C4 et 35S::319a_1_2/G1 ont un nombre de paraclades caulinaires réduit (2.86, 2.86, 2.85 et 2.93 paraclades caulinaires en moyenne respectivement) par rapport à la lignée sauvage Col0 (3.6 paraclades caulinaires en moyenne). Cependant, il est à noter que le ratio nombre de paraclades caulinaires / nombre de feuilles caulinaires (ratio PC/FC) est égal à 1 chez toutes les lignées, ce qui signifie qu'il n'y a pas d'effet de la surexpression des pre-miR319a et 319b sur la différenciation des bourgeons à l'aisselle des feuilles caulinaires de l'inflorescence ni sur leur capacité à produire un axe inflorescentiel secondaire (Figure 75 F).

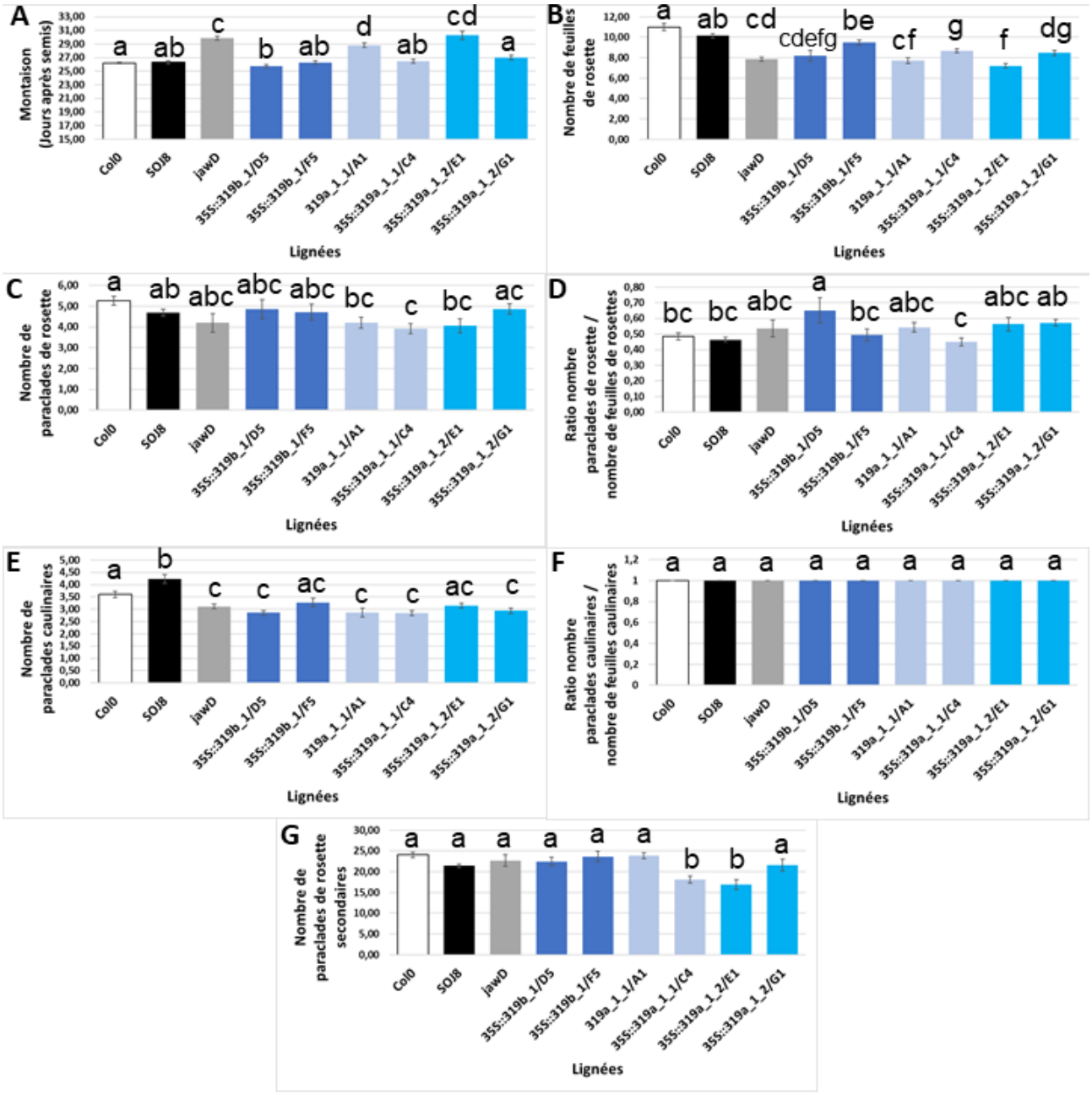

Figure 75 : **Phénotypes des différentes lignées transgéniques surexprimant les pre-miR319 de *Rosa* 'Radrazz' et d'*Arabidopsis* (*jawD*) et d'un mutant gène cible résistant au miR319 chez *Arabidopsis* (*soj8*).** A : Suivi de la montaison (émergence de l'axe principal à 0.5 cm au-dessus des feuilles de rosette) en jours après semis. B : Nombre de feuilles de rosette. C : Nombre de paraclades de rosettes. D : Nombre de paraclades caulinaires. E : Ratio du nombre de paraclades de rosette / nombre de feuilles de rosettes. F : Ratio du nombre de paraclades caulinaires / nombre de feuilles caulinaires. G : Nombre de paraclades de rosette secondaires. Les barres d'erreur représentent les erreurs standards. Les lettres représentent le phénotype significatif de la lignée par rapport à la lignée sauvage Col0 ($p<0.05$).

Et enfin concernant le développement des paraclades d'ordre 2 sur les paraclades de rosettes, seules les lignées 35S::319a_1_1/C4 et 35S::319a_1_2/E1 ont un nombre réduit de paraclades d'ordre 2 (18.09 et 16.86 en moyenne respectivement) par rapport à la lignée sauvage Col0 (24.07 en moyenne) (Figure 75 G).

Comme nous avons pu observer Figure 73, les lignées 35S::319a_1_1/A1 et 35S::319a_1_2/E1 ont aussi un phénotype foliaire similaire à celui de la lignée *jawD*. Nous pouvons donc conclure à une similarité de phénotypes pour ces lignées concernant la montaison, le nombre de feuilles de rosette, le ratio PR/FR et le nombre de paraclades caulinaires.

Nous avons également observé le phénotype de la lignée *soj8*, qui présente une mutation dans le site de fixation du miR319 d'*Arabidopsis* sur le gène *AthTCP4*. Nous pouvons nous attendre éventuellement à observer un phénotype inverse de cette lignée par rapport à la lignée *jawD*, surexprimant le miR319a d'*Arabidopsis*. Cependant, nous avons observé que la lignée *soj8* présentent un phénotype similaire à la lignée sauvage Col0, excepté pour le nombre de paraclades caulinaires où la lignée présente significativement un nombre plus élevé de paraclades caulinaires (4.23 en moyenne) par rapport à la lignée sauvage (3.6 paraclades caulinaires en moyenne). Cette lignée n'a donc pas de phénotype inverse avec *jawD*.

En conclusion, sur la base de notre phénotypage, la surexpression du pre-miR319a_1_1 et pre-miR319a_1_2 conduit à des phénotypes similaires à ceux induits par la surexpression du pre-miR319a d'*Arabidopsis* (*jawD*). Cela signifie que les miARNs matures issus de ces pre-miARNs de rosier pourraient cibler les mêmes gènes que le miR319 mature d'*Arabidopsis*. Également, la surexpression des pre-miRs 319a_1 de rosier entraînerait une diminution du nombre de paraclades de rosettes.

Concernant la surexpression du pre-miR319b_1 du rosier, cela entraînerait uniquement une diminution du nombre de feuilles de rosette, ce qui pourrait suggérer que miR319a et b n'ont pas totalement les mêmes cibles. Les différents membres de la famille miR319 pourraient avoir des rôles différents et spécifiques dans le développement des plantes, résultant probablement d'une diminution du nombre de feuilles de rosette.

De plus, la lignée *soj8*, portant sur le gène *AthTCP4* une mutation sur le site de fixation du miR319, ne présente pas de phénotype inverse à la lignée surexprimant le miR319 d'*Arabidopsis jawD*. Cela peut nous laisser émettre les hypothèses que le phénotype induit par la surexpression du mir319 passe par une cible différente que *AthTCP4* ou bien que ce phénotype fasse intervenir d'autres *TCPs* (par redondance de fonctions). Il serait intéressant d'étudier une lignée TCP4 résistante au miR319 chez le rosier afin de voir si nous observons le même phénotype que la lignée *soj8*.

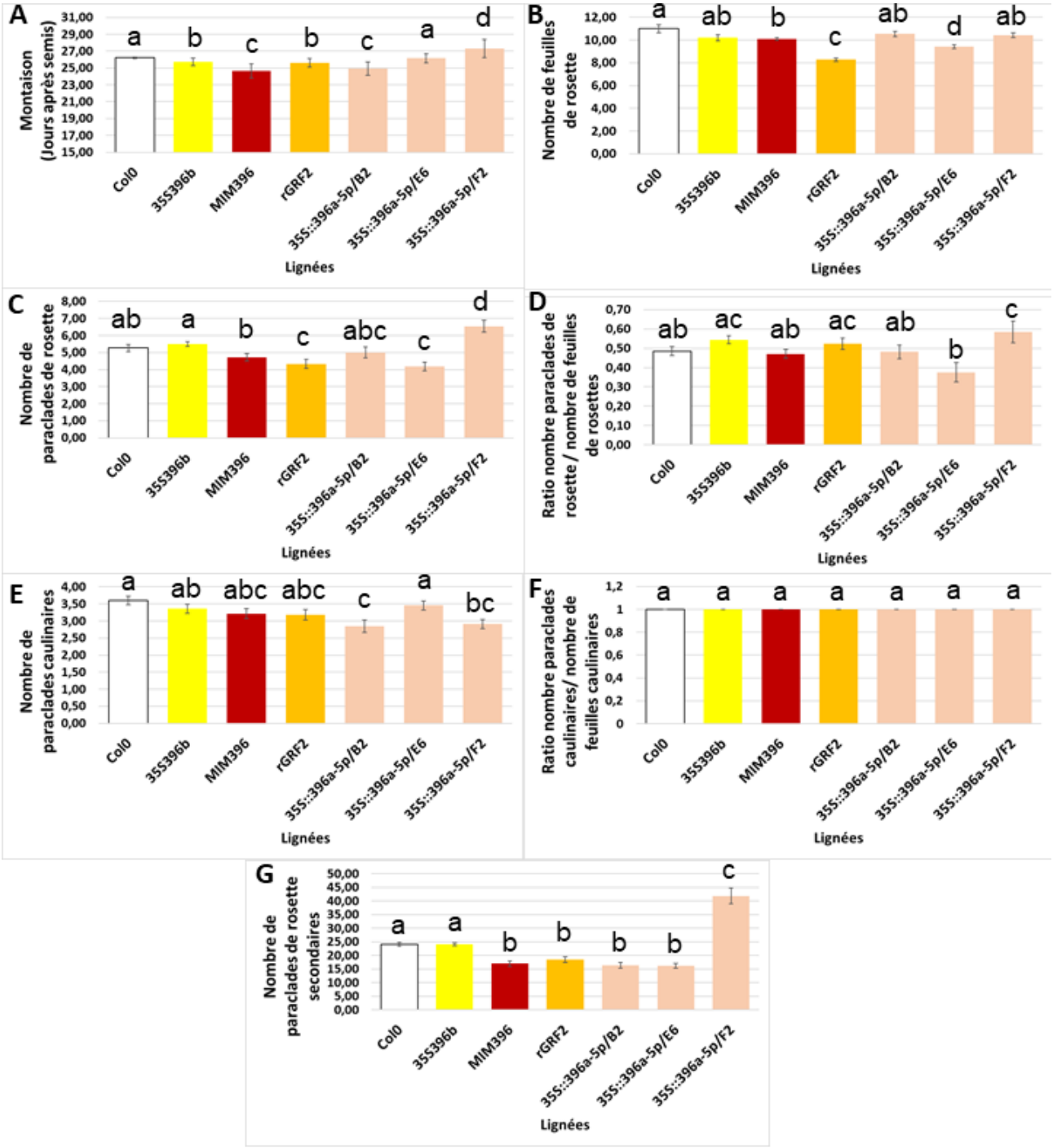

Figure 76 : **Phénotypes des différentes lignées transgéniques surexprimant les pre-miR396 de *Rosa* 'Radrazz' et d'*Arabidopsis* (35S396b), d'un mutant gène cible résistant au miR396 (rGRF2) et d'un mutant d'inactivation du miR396 chez *Arabidopsis* (MIM396).** A : Suivi de la montaison (émergence de l'axe principal à 0.5 cm au-dessus des feuilles de rosette) en jours après semis. B : Nombre de feuilles de rosette. C : Nombre de paraclades de rosettes. D : Nombre de paraclades caulinaires. E : Ratio du nombre de paraclades de rosette / nombre de feuilles de rosettes. F : Ratio du nombre de paraclades caulinaires / nombre de feuilles caulinaires. G : Nombre de paraclades de rosette secondaires. Les barres d'erreur représentent les erreurs standards. Les lettres représentent le phénotype significatif de la lignée par rapport à la lignée sauvage Col0 ($p \leq 0.05$).

2.2.2. Analyses phénotypiques des lignées transgéniques rGRF2, MIM396, 35S396b, 35S::396a-5p.

Les trois lignées 35S::396a-5p/B2, 35S::396a-5p/F2 et 35S::396a-5p/E6 présentent des phénotypes différents pour les caractères étudiés.

Concernant le nombre de feuilles de rosette, la lignée 35S::396a-5p/E6 présente un nombre réduit de feuilles de rosette (9.43 feuilles en moyenne) par rapport à la lignée sauvage Col0 (11 feuilles en moyenne) (Figure 76 B).

De plus, pour le nombre de paraclades de rosette, la lignée 35S::396a-5p/E6 a un nombre plus réduit de paraclades de rosette (4.18 en moyenne) par rapport au sauvage (5.27 en moyenne), alors que la lignée 35S::396a-5p/F2 aurait, elle, une augmentation du nombre de paraclades de rosette (6.54 en moyenne) (Figure 76 C). La lignée 35S::396a-5p/B2 n'a pas de différence significative avec la lignée sauvage.

Egalement, nous pouvons observer que le ratio PR/FR est significativement plus élevé pour la lignée 35S::396a-5p/F2 (0.59) que la lignée sauvage Col0 (0.48), reflétant l'augmentation significative du nombre de paraclades de rosettes pour un nombre de feuilles de rosette inchangé. Cette lignée aurait donc une capacité de développement ou de débourrement de ses bourgeons plus important que la lignée sauvage (Figure 76 D).

Concernant la montaison, la lignée 35S::396a-5p/B2 a une montaison plus précoce que la lignée sauvage Col0 (environ 1.27 jours plus précoce). La lignée 35S::396a-5p/E6 ne se distingue pas de la lignée sauvage et la lignée 35S::396a-5p/F2, elle, a un retard de montaison (environ un jour plus tard) (Figure 76 A).

Concernant l'architecture de l'inflorescence, nous pouvons noter que les lignées 35S::396a-5p/B2 et 35S::396a-5p/F2 ont un nombre plus réduits de paraclades caulinaires sur l'axe principal (2.85 et 2.91 en moyenne respectivement) que la lignée sauvage (3.6 en moyenne) (Figure 76 E).

De plus, nous retrouvons le même phénotype pour le ratio PC/FC que chez les lignées transgéniques pre-miR319, qui est également égal à 1 chez toutes les lignées pre-miR396, ce qu'il signifie qu'il n'y a pas d'effet sur le développement et le débourrement des bourgeons à l'aisselle des feuilles caulinaires de l'inflorescence (Figure 76 F).

Concernant le nombre de paraclades d'ordre 2 sur les paraclades de rosette, les lignées 35S::396a-5p/B2 et 35S::396-5p/E6, ont un nombre plus réduit (16.33 et 16.18 en moyenne respectivement) que la lignée sauvage Col0 (24.07 en moyenne), alors que la lignée 35S::396a-5p/F2 a un nombre significativement plus élevé (41.89 en moyenne) (Figure 76 G).

Nous n'avons pas pu comparer nos lignées 35S::396a-5p avec un lignée surexprimant le pre-miR396a d'*Arabidopsis* mais nous avions à disposition la lignée 35S396b, surexprimant le pre-miR396b d'*Arabidopsis*. Cette lignée a un phénotype similaire à la lignée sauvage Col0, excepté pour le jour de montaison qui est légèrement plus précoce (environ 1 jour plus tôt) par rapport à la lignée sauvage. La lignée 35S::396a-5p/B2 présente un phénotype similaire à la lignée 35S396b excepté pour le jour de montaison qui est plus précoce pour la lignée 35S::396a-5p/B2 et un nombre de paraclade de rosette d'ordre 2 plus élevé par rapport à la lignée 35S396b.
La lignée 35S396b présente beaucoup de différences avec la lignée 35S::396a-5p/E6. En effet, la lignée 35S::396a-5p/E6 a un nombre de feuille de rosette, nombre de paraclade de rosette, le ratio PR/FR et le nombre de paraclade de rosette d'ordre 2 plus réduit, ainsi qu'un nombre de paraclades caulinaires plus élevé par rapport à la lignée 35S396b. Et enfin, la lignée 35S::396a-5p/F2 possède un nombre de paraclade de rosette, le ratio PR/FR et le nombre de paraclade de rosette d'ordre 2 plus élevé que la lignée 35S396b.

Nous avons également étudié une lignée présentant une mutation sur le site de fixation du miR396 sur le gène *AthGRF2*, entraînant une résistance du gène *GRF2* au miR396, nommée rGRF2 et une lignée "mimicry" entraînant l'inactivation partielle du miR396 appelée MIM396. Nous pouvons nous attendre qu'une de ces lignées, voire les deux, pourraient présenter un phénotype inverse aux lignées 35S::396a-5p.

Nous avons tout d'abord remarqué une accélération du jour de montaison pour ces deux lignées (environ un et deux jours plus tôt respectivement). Il a été montré qu'une surexpression de *AthGRF1* et *AthGRF2* entraîne un retard de montaison chez *Arabidopsis*, cultivé en jour long (Kim et al., 2003). Cela serait concordant avec les résultats observés pour les lignées 35SAth396b et 35S::396a-5p/B2 mais cela n'explique pas pourquoi nous observons une accélération du jour de la montaison pour la lignée MIM396 et la lignée gène cible résistant *rGRF2*.

De même, l'inactivation partielle du miR396 (lignée *MIM396*) ou la résistance à ce miARN (lignée rGRF2) entraînerait une réduction du nombre de feuilles de rosette, ce qui est concordant avec le phénotype d'accélération de montaison observé pour ces lignées (Figure 76 B).

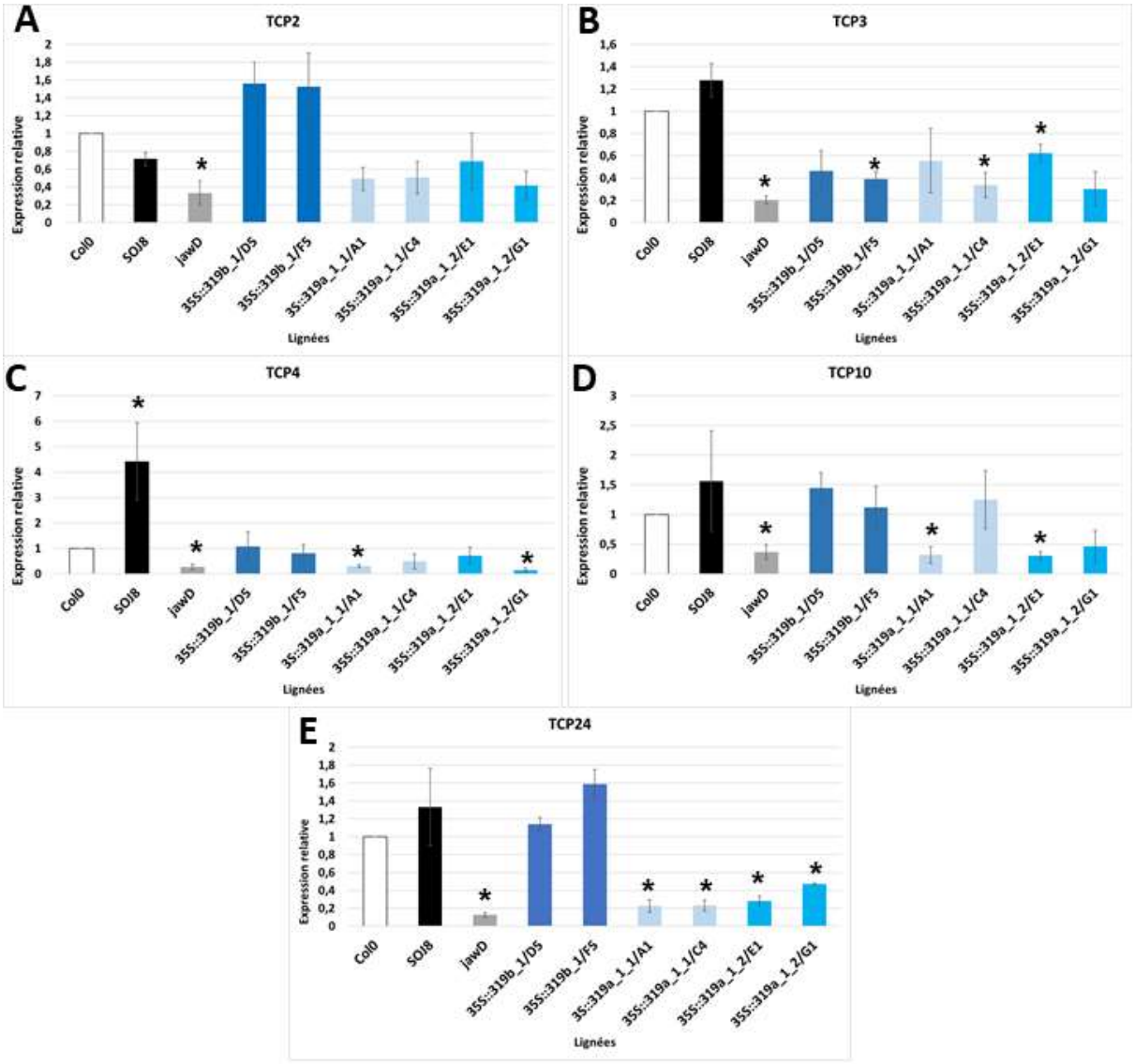

Figure 77 : **Variation de l'expression des 5 gènes *AthTCPs* pouvant être ciblés par la famille miR319 chez les différentes lignées d'*Arabidopsis* étudiées**. A : Expression du gène *AthTCP2*. B : Expression du gène *AthTCP3*. C : Expression du gène *AthTCP4*. D : Expression du gène *AthTCP10*. E : Expression du gène *AthTCP24*. Les barres d'erreur représentent les erreurs standards. Les astérisques représentent l'expression significative du gène par rapport à son expression dans la lignée sauvage Col0 ($p \leq 0.05$).

De plus, pour le nombre de paraclades de rosette, les lignées *MIM396*, *rGRF2* et 35S::396a-5p/E6 ont un nombre plus réduit de paraclades de rosette (4.71, 4.33 et 4.18 en moyenne respectivement) par rapport à la lignée sauvage (5.27 en moyenne), alors que la lignée 35S::396a-5p/F2 a un phénotype inverse aux lignées *MIM396* et *rGRF2* par l'augmentation du nombre de paraclades de rosette (6.54 en moyenne) (Figure 76 C).

Tandis que pour le nombre de paraclades de rosette d'ordre 2, les lignées *MIM396*, *rGRF2*, 35S::396a-5p/B2 et 35S::396-5p/E6, ont un nombre plus réduit (17, 18.4, 16.33 et 16.18 en moyenne respectivement) par rapport à la lignée Col0 (24.07 en moyenne), alors que le mutant 35S::396a-5p/F2 a un nombre significativement plus élevé (41.89 en moyenne) (Figure 76 G).

En conclusion, nous n'avons pas pu observer de phénotypes communs entre les trois lignées 35s::396a-5p sur les paramètres phénotypiques que nous avons suivis. Nous avons pu observer un phénotype inverse chez la lignée 35S::396a-5p/F2 qui serait hyper ramifié par rapport à la lignée sauvage Col0 et aurait un retard du jour de montaison, ce qui ferait un bon candidat dans une étude plus poussée de l'effet de miARN dans le contrôle du débourrement.

Par ailleurs, les lignées 35S::396a-5p/B2 et 35S::396a-5p/F2 possèdent également des feuilles de rosette légèrement allongées, en forme de spatule (Figure 74). Cependant, nous ne retrouvons pas les mêmes comportements phénotypiques de ces deux lignées dans les paramètres suivis. Nous pouvons émettre l'hypothèse que soit le phénotype feuilles en forme de spatule n'explique pas forcément les phénotypes de développement des bourgeons, soit que les paramètres suivis ne permettent pas d'expliquer ce phénotype foliaire commun.

De plus, une inactivation de l'activité du miR396 ou la résistance du gène *GRF2* à ce miARN entraînerait une accélération du jour de montaison et une réduction du développement des bourgeons axillaires chez *Arabidopsis*, se traduisant par une diminution du nombre de feuille de rosette et du nombre de paraclades de rosette.

2.3. Suivi de l'expression des gènes cibles chez les lignées *Arabidopsis*

Nous avons vu dans le chapitre 3 que les miR319a_1 et 319b_1 ne seraient capables de cibler que les gènes *RhTCP2* et *4* de *Rosa* 'Radrazz'. Or, il a été montré dans la littérature que la famille miR319 chez *Arabidopsis* pourrait cibler les *AthTCP2*, *3*, *4*, *10* et *24* (Koyama et al., 2017).

Nous avons étudié dans un premier temps le profil d'expression de ces gènes *TCPs* d'*Arabidopsis* afin d'identifier lesquels sont affectés dans les différentes lignées transgéniques.

Tableau XII : Nombre de *TCPs* cibles potentielles de la famille miR319 chez différentes espèces.
Les miARNs matures des espèces ont été extraits de la base donnée miRBase (http://www.mirbase.org/index.shtml). Les séquences des *TCPs* chez ces espèces ont été extraites sur le site Plant Transcription Factor Database (Tian et al., 2019, planttfdb.gao-lab.org) . La prédiction de gènes cibles a été réalisée à l'aide de l'outil PsRNATarget (Dai et al., 2018 ; https://www.zhaolab.org/psRNATarget/) en utilisant un score de prévision ≤ 3.5 afin d'éviter des résultats faux-positifs.

Nom de l'espèce	Genre	Nombre de *TCPs* prédits comme cibles d'un miR319
Arabidopsis thaliana	Brassicacées	5 (*TCP 2/3/4/10/24*)
Arabidopsis lyrata		5 (*TCP 2/3/4/10/24*)
Brassica rapa		5 (*TCP 2/3/4/10/24*)
Cucumis melo	Cucurbitacées	2 (*TCP 2/4*)
Hevea brasiliensis	Euphorbiaceae	2 (*TCP 2/4*)
Vitis vinifera	Vitaceae	2 (*TCP 2/4*)
Fragaria vesca	Rosaceae	2 (*TCP 2/4*)

Toutes les expressions de gènes chez les lignées étudiées sont comparées à l'expression de ces mêmes gènes chez la lignée sauvage Col0 et ont été réalisé par RT-qPCR sur des feuilles de rosette prélevées en fin de croissance juste avant l'ensachage des plantes (silique mature).

Tout d'abord, le gène *AthTCP2* est réprimé seulement chez la lignée *jawD* (environ 3 fois moins exprimé) alors que chez les autres lignées, le gène n'est pas considéré comme différentiellement exprimé par rapport à la lignée sauvage (Figure 77 A). Mais nous pouvons remarquer tout de même qu'il y a une nette diminution d'expression de Ath*TCP2* chez les lignées transgéniques du pre-miR319a_1 de rosier par rapport à la lignée sauvage Col0 alors que nous n'observons pas la même chose pour les lignées transgéniques du pre-miR319b_1. Cependant cette diminution d'expression de *AthTCP2* chez les lignées 35S::319a_1 n'est pas validé statistiquement. Il y aurait potentiellement une régulation du gène *AthTCP2* uniquement par le miR319a.

Concernant le gène *AthTCP3*, ce gène semble être ciblé par les miR319a et 319b étant sous-exprimés chez les lignées pre-miR319 *jawD*, 35S::319b_1/F5, 35S::319a_1_1/C4 et la lignée 35S::319a_1_2/E1 (environ 5, 2.5, 3 et 2 fois mois exprimés respectivement) (Figure 77 B).

Pour le gène *AthTCP4*, nous observons bien une augmentation du gène chez la lignée gène cible résistant soj8 (4.4 fois plus exprimé), ce qui montre bien que ce gène est bien résistant au miR319 et donc n'est pas réprimé par ce miARN. De plus, chez les lignées surexprimant le pre-miR319a *jawD*, 35S::319a_1_1/A1 et 35S::319a_1_2/G1, le gène *AthTCP4* est significativement moins accumulé par rapport au sauvage (environ 3.7, 3.3 et 7 fois moins exprimés respectivement) (Figure 77 C). Ce gène ne semble pas être réprimé chez les lignées 35S::319b_1.

De plus, le gène *AthTCP10* est significativement réprimé chez les lignées *jawD*, 35S::319a_1_1/A1 et 35S::319a_1_2/E1 (2.77, 3.2 et 3.3 fois moins exprimés respectivement) (Figure 77 D). Nous pouvons également observer une diminution de l'expression de *AthTCP10* chez la lignée 319a_1_2/G1 mais elle n'est pas significative.

Et enfin, le gène *AthTCP24* semblerait être régulé uniquement par le miR319a car nous pouvons observer sa répression significative chez toutes les lignées surexprimant du pre-miR319a (*jawD*, 35S::319a_1_1/A1, 35S::319a_1_1/C4, 35S::319a_1_2/E1 et 35S::319a_1_2/G1) alors que ce n'est pas le cas pour les lignées surexprimant le pre-miR319b_1 (Figure 77 E).

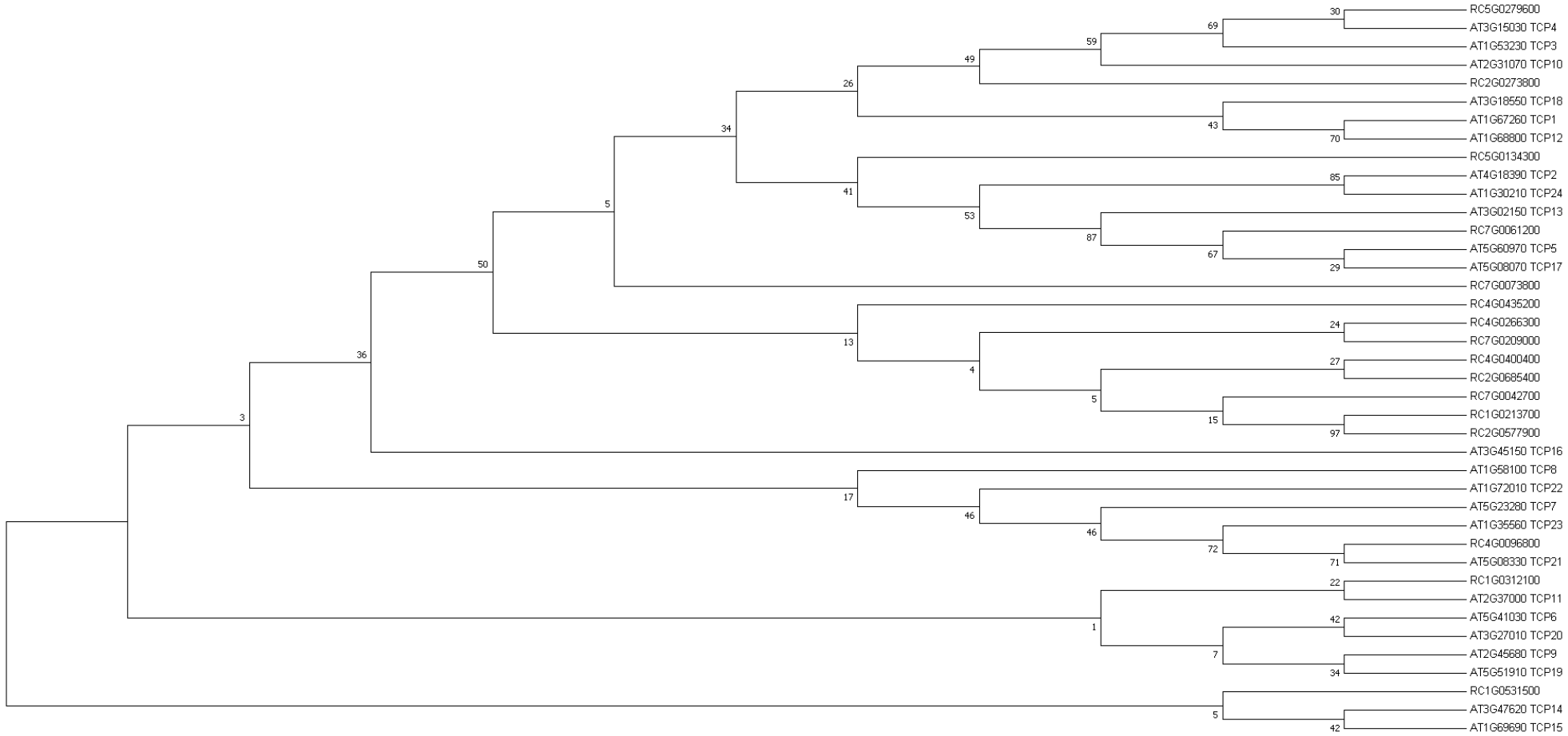

Figure 78 : **Structure de la famille multigénique TCPs.** Arbre phylogénétique (maximum de vraisemblance) des séquences protéiques des TCPs d'*Arabidopsis thaliana* et de *Rosa chinensis*.

En conclusion, le miR319a_1 de rosier serait potentiellement capable de cibler des *TCPs* comme chez *Arabidopsis*. Cependant la famille miR319 ciblerait uniquement *TCP2* et *TCP4* chez le rosier. Nous avons réalisé une rapide analyse de la conservation du nombre de *TCPs* ciblés par la famille miR319 en fonction de l'espèce végétale. Pour cela, nous avons confronté la liste des miARNs matures annotés de ces espèces sur miRBase au génome de cette même espèce et cherché si des *TCPs* étaient prédits comme cibles de la famille miR319 (Tableau XII).

Il semblerait y avoir une spécificité des Brassicacées qui présentent 5 *TCPs* cibles de la famille miR319. Chez les autres dicotylédones étudiées, et comme chez le rosier, seuls deux *TCPs* (*TCP2* et *TCP4*) apparaissent comme des cibles potentielles des miR319.

Nous avons réalisé un arbre phylogénétique à partir des séquences protéiques entières des TCP d'*Arabidopsis* et de *Rosa chinensis* (Figure 78). Sur cet arbre, nous observons que RhTCP4 est proche des TCP AthTCP4, AthTCP3 et AthTCP10. De même, la protéine RhTCP2 est proche des TCP AthTCP2 et AthTCP24. Il semblerait donc qu'il n'y ait pas de protéines TCP chez le rosier qui soit proche des AthTCP3, AthTCP10 et AthTCP24. Ceci expliquerait pourquoi seuls *TCP2* et *TCP4* peuvent être prédits comme cibles de la famille miR319 chez le rosier. Une étude phylogénique plus poussée serait intéressante à mener pour comprendre l'évolution de la famille TCP et son interaction avec miR319 chez les dicotylédones et monocotylédones.

Dans cette thèse, l'expression de tous les *GRFs* pouvant être ciblés par miR396 chez *Arabidopsis* a été étudiée.

Nous pouvons tout d'abord noter que chez la lignée MIM396, où miR396 d'*Arabidopsis* est partiellement inactivé, les quantités d'ARNm de *GRF1*, *2*, *3*, *4* et *7* augmentent par rapport à la lignée sauvage Col0. Ceci montre bien que lorsque miR396 est inactivé, ces gènes ne sont plus régulés par ce miARN. De même, nous observons bien une induction de l'expression du gène *GRF2* chez la lignée résistante au miR396 rGRF2 (13.8 fois plus exprimés), confirmant bien sa résistance au miR396 (Figure 79 B).

Cependant, peu de *GRFs* semblent être réprimés chez les lignées 35S::396a-5p de rosier. En effet, seuls les gènes *GRF1*, *3*, *8* et *9* sont réprimés chez la lignée 35S::396a/B2 et non chez les lignées 396a-5p/E6 et 396a-5p/F2 (Figure 79 A/C/F/G).

Toutefois, les transcrits du gène *AthGRF9* étaient très peu détectés après amplification qPCR chez les lignées 35SAth396b et 35S::396a-5p/E6. Ceci suggère que ce gène est potentiellement réprimé par le miR396 (Figure 79 G).

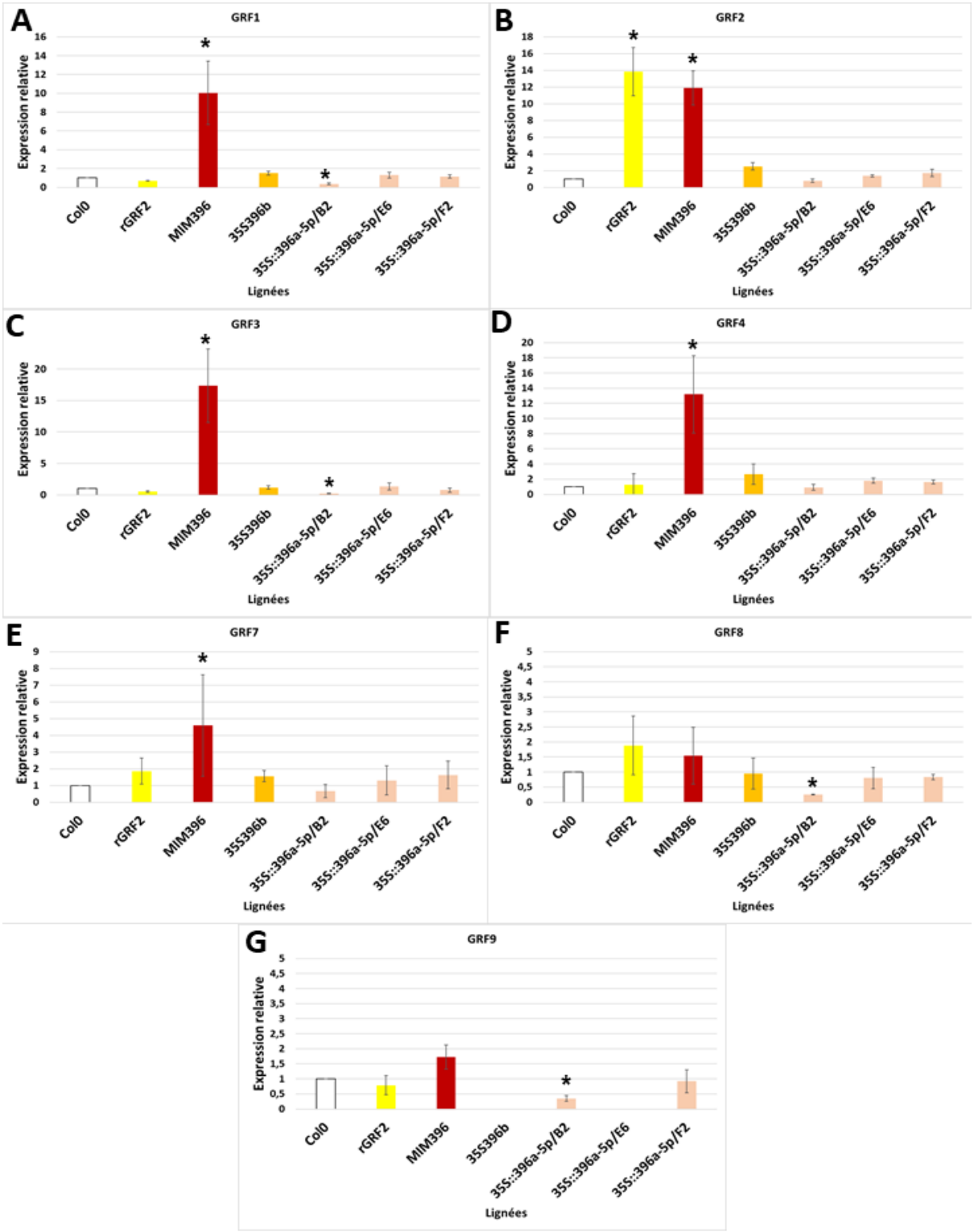

Figure 79 : **Variation de l'expression des 7 *AthGRFs* cibles potentielles des miR396 chez les différentes lignées d'Arabidopsis étudiées.** A : Expression du gène *AthGRF1*. B : Expression du gène *AthGRF2*. C : Expression du gène *AthGRF3*. D : Expression du gène *AthGRF4*. E : Expression du gène *AthGRF7*. F : Expression du gène *AthGRF8*. G : Expression du gène *AthGRF9*. Les barres d'erreur représentent les erreurs standards. Les astérisques représentent l'expression significative du gène par rapport à son expression dans la lignée sauvage Col0 ($p \leq 0.05$).

Nous avions vu dans la partie précédente que la lignée 35S::396a-5p/F2 était intéressante car elle présentait un phénotype inverse aux mutants *rGRF2* et *MIM396*. Cependant, nous n'observons aucun *GRF* réprimé chez cette lignée 35S::396a-5p/F2 ce qui suggère que le phénotype dans cette lignée n'est pas expliqué par la répression des *GRFs*.

Le fait que si peu de *GRF* soient réprimés au sein de nos lignées transgéniques pourrait être dû à une récolte trop tardive des échantillons de ces génotypes. Celle-ci a été effectuée en fin de croissance (silique mature). Nous n'observons alors peut-être pas l'effet direct du miR396 sur ces *GRFs* mais plutôt le résultat de boucles de régulation et d'autres régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles qui auraient pu avoir lieu au cours de la croissance. De même, il n'est pas très étonnant de trouver ces *GRFs* si peu exprimés chez nos lignées et même dans la lignée sauvage Col0. Kim et al. (2003) ont étudié l'expression de tous les *GRFs* chez *Arabidopsis* sur différents organes et ont montré que ces *GRFs* sont moins exprimés dans des feuilles matures par rapport aux racines ou dans de jeunes fleurs. Nos expériences étant réalisées sur des feuilles de rosette matures, ces résultats concordent avec la faible expression des *GRFs* que nous observons.

3. Discussion et conclusions

Nous avons dans ce chapitre étudié le phénotype de lignées d'*Arabidopsis* surexprimant les pre-miR319a_1, 319b_1 et 396a-5p de rosier.

Tout d'abord, nous avons observé que les lignées 35S::319a_1_1/A1 et 35S::319a_1_2/E1 présentaient un phénotype très similaire au mutant *jawD*, surexprimant le pre-miR319a d'*Arabidopsis* concernant le temps de montaison, la morphologie foliaire et le nombre de paraclades de rosettes. Nous pouvons noter que ce sont ces lignées (35S::319a_1_1/A1 et 35S::319a_1_2/E1) qui ont une accumulation de transcrits la plus forte (Figure 72). La surexpression des pre-miR319a_1 et 319b_1 de rosier entraîne une diminution du nombre de feuilles de rosette. Comme aucune diminution significative du ratio PR/FR est observée chez ces lignées, il apparaît que la surexpression du miR319 n'affecte vraisemblablement ni l'initiation des bourgeons ni leur débourrement. La diminution du nombre de paraclades de rosette chez ces lignées serait donc due au moindre nombre de phytomères (feuilles, bourgeons axillaires et entre-nœuds) constituant la rosette. Ce résultat est cohérent avec les rôles du miR319 et des *TCPs* dans la morphogenèse foliaire par le contrôle de la croissance des feuilles et le développement de leur marge (Palatnik et al., 2003 ; Koyama et al., 2010).

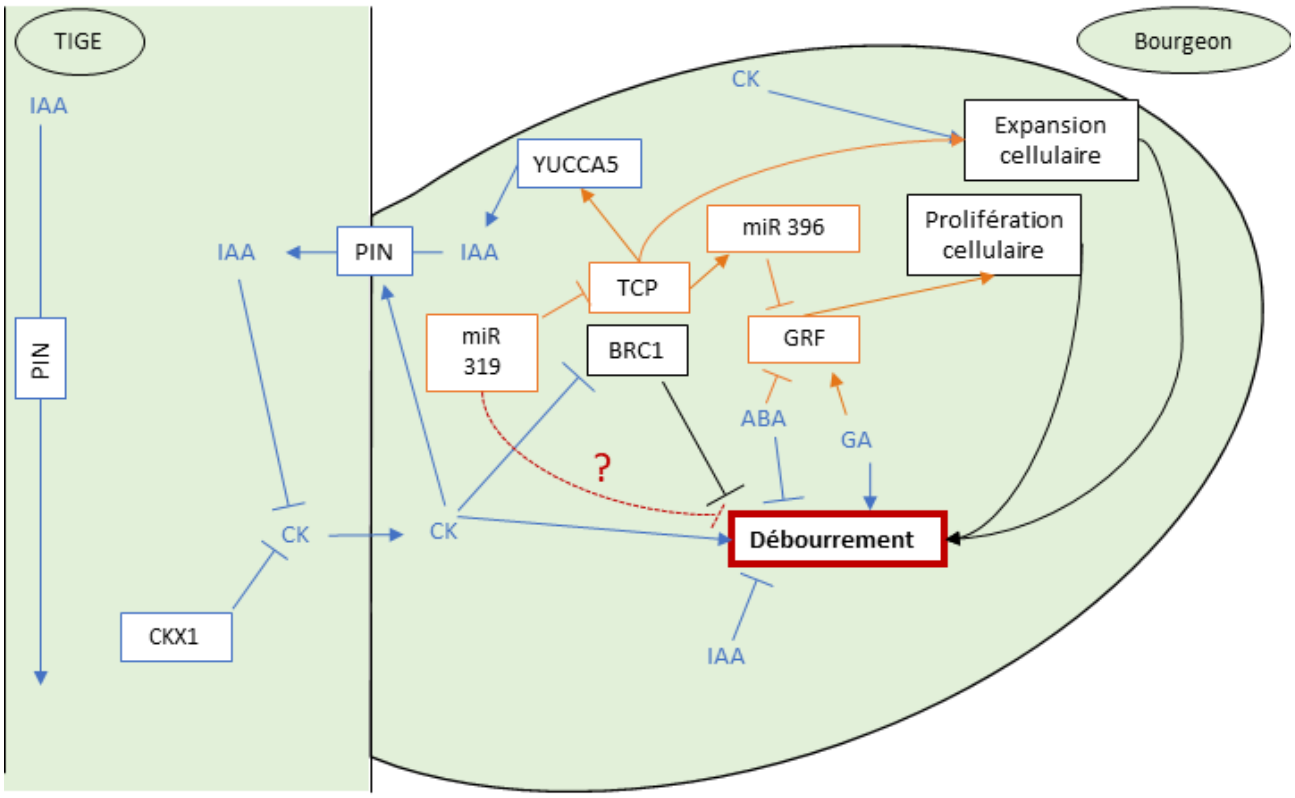

Figure 80 : **Modèle de régulation du débourrement du bourgeon par les miR319 et miR396.** Ce modèle est basé sur nos résultats et les données de la littérature*. Les miARNs ainsi que leur gènes cibles impliqués dans le contrôle du débourrement selon la littérature sont représentés en orange. Les résultats obtenus de notre analyse de phénotype sont représentés en rouge pointillé. Les flèches représentent une induction, les lignes droites représentent une répression. *Van der Knaap 2000 ; Chai et al., 2004 ; Horigushi, 2005 ; Rodriguez et al., 2010 ; Challa et al., 2016 ; Wu et al., 2021.

Nos résultats montrent que chez le rosier, la famille miR319 est fortement réprimée 96 heures après décapitation à la lumière alors que le gène *TCP4* est lui fortement induit (Chapitre III). La néo-organogénèse des feuilles étant une des composantes du débourrement chez le rosier, nos résultats suggèrent que miR319 pourrait avoir un effet répresseur du débourrement des bourgeons via le contrôle de la morphogenèse foliaire.

Potentiellement, les phénotypes des lignées 35S::319a_1_1/A1 et 35S::319a_1_2/E1 pourraient être expliqués par la répression des *AthTCP3*, *4*, *10* et *24* chez des lignées 35S::319a (Figure 77). Cependant, nous n'avons pas trouvé d'orthologue des *TCP3*, *10* et *24* dans le génome de *Rosa chinensis* ce qui laisse penser que l'orthologue *TCP4* de rosier est celui qui interagit avec miR319 chez cette espèce.

Toutefois, la lignée *soj8*, dont le gène *AthTCP4* est résistant au miR319, ne présente pas de phénotype inverse à la lignée surexprimant miR319 en terme de nombre de feuilles ou de temps de floraison. Le gène *TCP4* ne serait alors peut-être pas la seule cible de miR319 dans le contrôle de ces phénotypes. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier le phénotype de double ou triple mutants de plusieurs *TCP* résistants au miR319.

Concernant l'étude de miR396a-5p, nous avons remarqué que les trois lignées surexprimant le pre-miR396a-5p n'ont pas les mêmes phénotypes. Notamment, seule la lignée 35S::396a-5p/F2 a un phénotype inverse aux lignées rGRF2 et MIM396. Le phénotype de la lignée 35S::396a-5p/F2 se caractérise en particulier par un retard de montaison (alors que les deux autres lignées ont plutôt une montaison plus précoce) et une augmentation du nombre de paraclades de rosette. Cependant, aucun *GRF* ne semble réprimé chez cette lignée, ce qui suggère que le phénotype observé ne peut être expliqué par la répression de *GRFs* mais plutôt par celle d'autres gènes cibles. De même, aucun *GRF* n'est significativement exprimé dans la lignée 35S::396a-5p/E6.

Concernant la lignée 35S::396a-5p/B2, celle-ci présente la plus forte accumulation de transcrits du pre-miR396 et un phénotype de feuilles en forme de spatule (Figure 72). Les gènes *AthGRF 1*, *3*, *8* et *9* sont réprimés chez cette lignée aussi son phénotype pourrait-il potentiellement être expliqué par la répression de ces *GRFs*.

Enfin, nous avons pu noter que pour les lignées 35S::319 et 35S::396a-5p, le ratio PC/FC est égal à 1 chez toutes les lignées étudiées. Donc la surexpression des pre-miRs 319 et 396 de rosier chez *Arabidopsis* ne semble pas avoir d'effet sur la différenciation des bourgeons à l'aisselle des feuilles caulinaires de l'inflorescence ni sur leur capacité à produire un axe inflorescentiel secondaire. Il a été montré que les méristèmes axillaires caulinaires se développent différemment des méristèmes axillaires de rosette chez *Arabidopsis*.

En effet, les méristèmes axillaires caulinaires semblent ne pas être soumis à une phase de dormance et se développent directement après leur initiation (Nicolas et al., 2022). De même, une mutation d'inhibiteurs du débourrement comme *BRC1* ou *MAX2* et *MAX3* n'ont pas d'effet sur le développement des méristèmes axillaires caulinaires (Stirnberg et al., 2002 ; Booker et al., 2004 ; Aguilar-Martínez et al., 2007).

De manière intéressante, il a été montré que TCP4 pouvait augmenter la transcription du *MiR396* chez *Arabidopsis*, entraînant l'inhibition de *GRFs* et donc empêchant la prolifération cellulaire (Schommer et al., 2014). Nous pouvons alors supposer l'existence d'un réseau de régulation entre le miR319 et miR396 dans le développement du bourgeon (Figure 80).

Par ailleurs, la recherche de gènes cibles que nous avons menée a été faite par prédiction *in silico*. Il reste à déterminer le rôle *in planta* du module miARN/gène cible ainsi que leur réelle interaction physique. Pour cela, nous avons réalisé des essais préliminaires sur des expériences de co-infiltrations sur feuilles de tabac entre nos constructions pre-miR319a_1 et 319b_1 avec une construction du gène cible *RhTCP4* fusionné à une protéine GFP. En présence d'une véritable interaction entre le miR319 et le gène *TCP4*, une diminution de la quantité de fluorescence produite par la GFP est attendue par rapport au témoin infiltré uniquement avec une construction *TCP4-GFP.* Ce travail préliminaire devra être poursuivi au-delà de cette thèse pour confirmer l'interaction miR319 et *TCP4*.

Conclusion générale

Le débourrement est un processus fondamental et complexe qui conditionne l'architecture des plantes et qui est dépendant de l'état physiologique du bourgeon. Le débourrement représente les premières étapes de la ramification des plantes qui est importante car elle influence notamment le rendement ou la qualité visuelle des plantes. En conséquence, des études ont été réalisées pour comprendre ce mécanisme complexe. Ce processus est finement régulé et fait intervenir différents facteurs endogènes comme les hormones (SL, IAA, GA, CK, ABA), les nutriments (sucres, azote) ainsi que les espèces réactives à l'oxygène (ROS). L'identification des mécanismes associés au débourrement a notamment été réalisée par l'étude de mutants présentant des phénotypes concernant la ramification chez plusieurs espèces comme *Arabidopsis*, le pois, le riz ou le pétunia (Napoli, 1996 ; Beveridge et al., 1997 ; Stirnberg et al., 2002 ; Booker et al., 2005 ; Snowden et al., 2005 ; Zou et al., 2006 ; Arite et al., 2007 ; Rameau et al., 2015) et enfin le rosier.

Les travaux réalisés par l'équipe ont porté sur le rosier (*Rosa* 'Radrazz'), qui a été choisi pour sa place importante dans l'horticulture ornementale et pour sa particularité d'avoir un besoin absolu de lumière pour déclencher le débourrement de ses bourgeons. Cette réaction en fait un modèle d'étude très intéressant pour l'étude du photo-contrôle du débourrement (Girault et al., 2008). Les travaux antérieurs menés par l'équipe sur ce photo-contrôle ont permis d'établir un réseau de régulations transcriptionnelles impliquant plusieurs acteurs (hormones/nutriments/ROS ; Figure 10) (Girault et al., 2008 ; Henry et al., 2011 ; Rabot et al., 2012 ; Rabot et al., 2014 ; Barbier et al., 2015 ; Roman et al., 2016 ; Corot et al., 2017 ; Bertheloot et al., 2020 ; Porcher et al., 2020 ; Porcher et al., 2021 ; Wang et al., 2021a). Cependant, à ce jour, il existe peu de connaissances sur les régulations post-transcriptionnelles du débourrement, en réponse à la lumière ainsi que sur les régulations du débourrement à des temps précoces (Sun et al., 2021).

C'est dans ce contexte que cette thèse a été engagée afin d'apporter des connaissances nouvelles sur les mécanismes post-transcriptionnels du contrôle du débourrement en en particulier sur le rôle des miARNs dans ce processus à un temps précoce. Les miARNs sont des petits ARNs non-codants simple brin d'une taille de 20-21 nucléotides impliqués dans divers processus de développement des plantes. Sur la base de leur complémentarité, les miARNs matures vont réguler un ARN messager cible pour déclencher son clivage et sa dégradation ou entraîner l'inhibition de sa traduction. Jusqu'à présent le clivage de l'ARNm cible est le mode d'action des miARNs de plantes de loin le plus répandu et le plus étudié et dans ce cas, nous pouvons supposer que la quantité d'ARNm diminue après fixation du miARN et que cette diminution sera visible dans le transcriptome.

Grâce au séquençage des ARNm et des petits ARNs présents dans les bourgeons, et à leur analyse croisée, nous avons identifié les miARNs conservés ainsi que de nouveaux miARNs présents dans les bourgeons à un temps précoce après la décapitation de la tige.

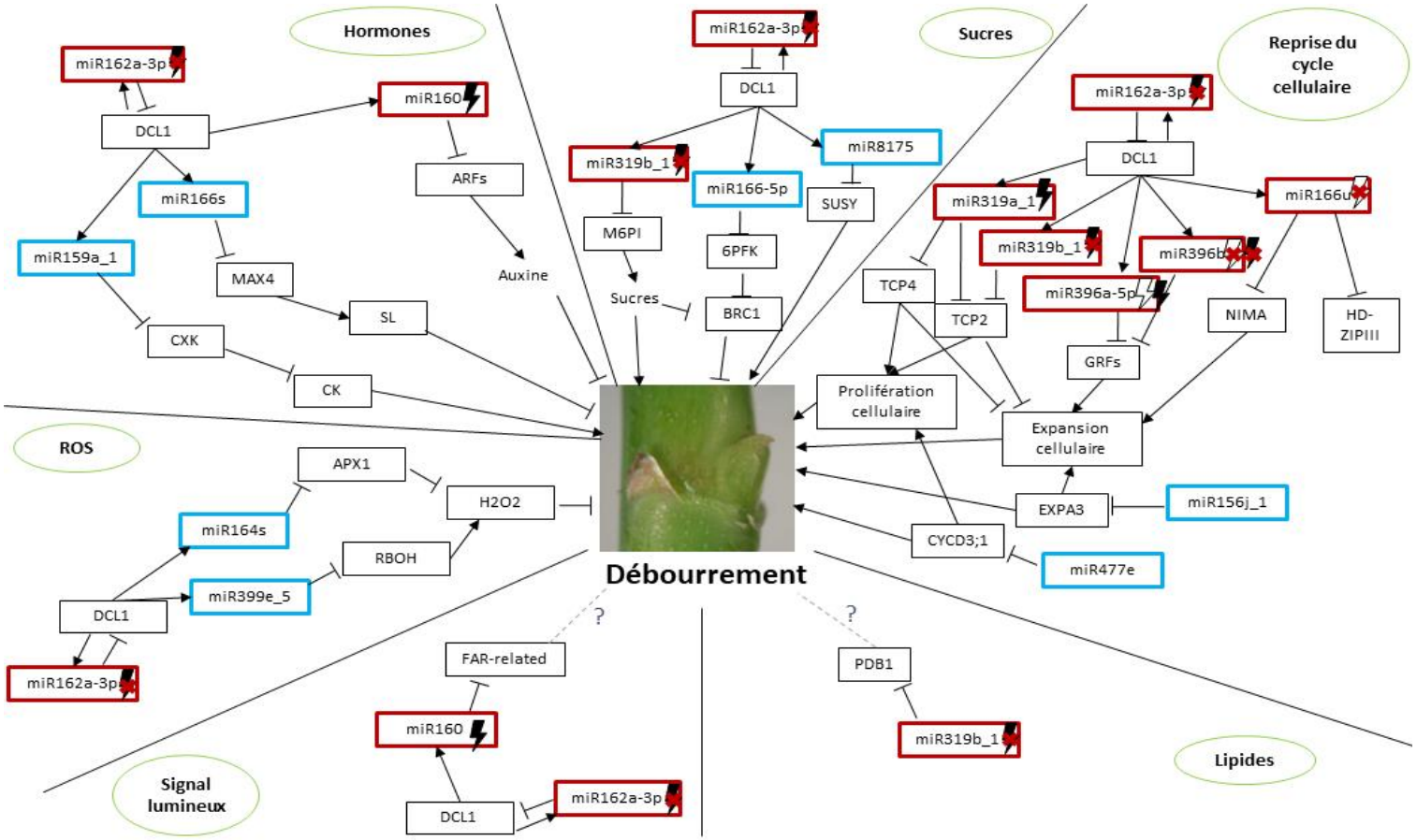

Figure 81 : **Modèle de régulation du débourrement par les miARNs et de son photo-contrôle chez le rosier.** (Eclair blanc : induction par la lumière, Eclair noir : induction à l'obscurité, Eclair + croix rouge : répression). Les flèches pleines représentent une induction, les barres représentent une répression et les barres en pointillé représentent le rôle potentiel dans le contrôle du débourrement qui reste à élucider. Les cadres bleus représentent les résultats issus du chapitre II et les cadres rouges, les résultats issus du chapitre III.

Nous avons recherché leurs gènes cibles potentiels et identifié des couples miARN-gène cible pouvant potentiellement jouer un rôle dans le débourrement et son photo-contrôle.

Ces analyses nous permettent d'établir un modèle de la régulation post-transcriptionnelle par les miARNs dans les phases précoces du débourrement chez le rosier (Figure 81). Ce modèle est discuté ci-après.

Rôle des miARNs dans le contrôle et le photo-contrôle du débourrement chez le rosier

Afin d'apporter des connaissances nouvelles sur les mécanismes post-transcriptionnels du contrôle du débourrement par les miARNs, nous avons réalisé un séquençage des ARNm et des petits ARNs provenant de bourgeons de rosier récoltés immédiatement après décapitation (t0) ou 6 heures après décapitation en condition de lumière (t6L) ou à l'obscurité (t6D).

La décapitation de l'apex de la tige permet de lever la dominance apicale et d'initier le débourrement des bourgeons axillaires, qui se caractérise par un rapide gonflement quelques heures après la décapitation quelles que soient les conditions d'éclairement (Girault et al., 2008). Dans le chapitre I, nous sommes partis de l'hypothèse que la décapitation permet l'activation (ou la répression) de certains mécanismes permettant d'initier (ou de bloquer, respectivement) le débourrement mais que l'absence de lumière chez le rosier entraîne un second verrouillage permettant de maintenir l'inhibition du débourrement.

La comparaison t0vst6L permet (i) de visualiser l'effet décapitation ou l'effet du cycle circadien, (ii) d'étudier l'effet temporel au cours du débourrement (de 0 à 6 heures après décapitation).

Quant à l'effet de la condition lumière proprement dit, la comparaison t6Lvst6D permet de comparer des échantillons dans deux conditions d'éclairement contrasté en se dédouanant de tout autre effet (temporel). Elle permet donc de passer outre ce qui résulte de l'effet de la décapitation et du cycle circadien ainsi que de la temporalité et d'étudier uniquement le photo-contrôle strict pendant une phase précoce du débourrement.

Les miARNs impliqués dans le contrôle du débourrement chez le rosier

Dans cette partie, nous allons discuter du rôle des miARNs dans le contrôle du débourrement suite à la levée de la dominance apicale (levée du premier verrouillage ; comparaison t0 vs t6L).

Dans un premier temps (Chapitre II), nous avons confirmé que chez le rosier, 7 familles de miARNs parmi les 9 conservées et rapportées dans la littérature (Tableau I en Introduction) semblent jouer un rôle dans le contrôle du débourrement (miR156, miR164, miR171, miR172 miR319, miR393, miR397, miR444 et miR529, Tableau VI). Les deux familles manquantes (miR444 et miR529) sont des familles qui semblent propres aux monocotylédones. Nous avons retrouvé chez ces 7 familles, les mêmes gènes cibles décrits dans la littérature chez d'autres espèces. Nous confirmons donc une conservation de ces familles et possiblement des processus de régulation qui leurs sont associés, dans le contrôle du débourrement chez le rosier. Ces résultats apportent de nouveaux éléments dans le modèle de régulation du débourrement chez le rosier

Puis, notre recherche de miARNs ciblant potentiellement des gènes connus pour leurs rôles dans le débourrement chez le rosier, nous a permis d'identifier des membres de 7 autres familles conservées de miARNs. A partir de notre analyse de prédiction *in silico*, ces miARNs seraient capables de cibler 9 gènes *CKX1/6*, *EXPA3*, *MAX4*, *CYCD3;1*, *SUSY*, *6PFK*, *APX1* et *RBOHB1* ; Tableau VII) parmi les 65 gènes identifiés par l'équipe comme acteurs du contrôle du débourrement (Figure 81, encadré bleu). Parmi ces 7 familles, seules les familles miR156 et miR164 ont été décrites précédemment dans la littérature comme jouant un rôle dans le contrôle du débourrement chez d'autres espèces (Tableau I en introduction). Uniquement très récemment, miR159 a été associé au développement du bourgeon et à sa dormance chez le pommier, par la régulation des facteurs de transcription *MYB* impliqués dans la signalisation des GA, appelés *GAMYB* (Garighan et al., 2021). Notre analyse met donc en évidence cinq nouvelles familles de miARN (miR159, miR166, miR399, miR477 et miR8175) potentiellement impliquées dans le débourrement via le contrôle des signalisations hormonales, du métabolisme des sucres et des ROS et de la reprise de croissance cellulaire. Ces miARNs ont été identifiés dans nos échantillons toutes conditions lumineuses confondues. Il serait intéressant d'étudier plus en détail l'expression de ces miARNs en fonction de la condition d'éclairement afin de savoir si ces miARNs sont impliqués dans le contrôle ou le photo-contrôle du débourrement. Nous pourrions également étudier leur expression sous d'autres conditions de traitement en lien avec les voies dans lesquelles ils sont impliqués (apport exogène d'hormones ou de sucres).

Puis dans un deuxième temps, par une approche sans *a priori*, nous avons étudié l'expression des miARNs dans les bourgeons de plantes exposées à la lumière ou à l'obscurité, 6 heures après décapitation. Nous avons identifié 7 miARNs matures différentiellement exprimés dans nos conditions (Figure 64). Ces 7 miARNs différentiellement exprimés appartiennent au total à 5 familles de miARNs conservées (Figure 81, encadré rouge). Parmi ces familles, seule la famille miR166 est commune avec notre précédente analyse basée sur l'approche candidat (Chapitre II). Sa détection au travers des deux approches renforce l'hypothèse que cette famille est impliquée dans le débourrement. Nous allons entrer plus en détails sur les rôles de ces 7 miARNs dans le contrôle et le photo-contrôle du débourrement.

Du fait de leurs profils d'expression, les 6 autres miARNs matures restent de bons candidats dans le contrôle du débourrement. En effet, certains de ces miARNs ont des profils d'expression reflétant un effet "décapitation". C'est le cas des miR396a-5p et miR396b qui ont des variations d'expressions similaires à 6h, quelle que soit la condition d'éclairement : le miR396a-5p est surexprimé alors que le miR396b est réprimé. Ces miARNs pourraient peut-être participer à la réponse à la blessure, pouvant entraîner des modifications dans la croissance de la plante. Cependant, selon la littérature, il a été montré que miR396 régule principalement la prolifération cellulaire, la taille des méristèmes ainsi que le nombre final de cellules dans les feuilles (Rodriguez et al., 2010 ; Debernardi et al., 2014). De plus, un blocage de l'effet du miR396 entraîne une induction de *OsGRF6* chez le riz, ce qui augmente le rendement par le développement de branches axillaires (Gao et al., 2015). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que cette famille serait potentiellement impliquée dans la réponse à la levée de dominance apicale après décapitation ce qui permettrait une reprise de croissance du bourgeon, et qui pourrait conduire à son gonflement visible quelle que soit la condition lumineuse (levée du premier verrou). Cependant, cet effet est limité à l'obscurité et ne suffit pas au débourrement, suggérant un blocage par un autre mécanisme qui pourrait être levé par la présence de lumière.

Concernant le contrôle du débourrement, le miR166u est réprimé à la lumière (t6L) par rapport au moment après décapitation t0 (éclair blanc avec une croix rouge). Ce miARN présente donc un intérêt dans l'étude du contrôle du débourrement. Cette famille joue un rôle de répresseur des gènes codant des facteurs de transcription HD-ZIP III, qui sont des FT impliqués dans l'établissement du MAC et la polarité des organes latéraux (McConnell et al., 2001 ; Zhang et Zhang, 2012). Dans notre analyse, le miR166u est réprimé dans la comparaison t0vst6L, ce qui suggère un rôle inhibiteur du débourrement pour ce miARN. En lien avec les données de la littérature, ce miR166 serait réprimé par la lumière au cours des phases précoces du débourrement afin de permettre le fonctionnement du MAC et l'organogenèse de nouveaux primordia lors de ce processus.

Les miARNs impliqués dans le photo-contrôle du débourrement.

Nous nous intéressons ici au rôle des miARNs impliqués dans le photo-contrôle du débourrement, par l'étude de la comparaison t6L vs t6D.

Tout d'abord, nous avons pu observer que le miR162a-3p est sous photo-contrôle et est réprimé dans la comparaison t6L vs t6D. Nous proposons que le miR162a-3p serait plutôt en amont du modèle de régulation. En effet, ce miARN est un répresseur du gène *DCL1* impliqué dans la biosynthèse des miARNs. Ce miARN pourrait réguler en aval la synthèse des miARNs impliqués dans le contrôle du débourrement. C'est pour cela que le miR162a-3p apparaît plusieurs fois dans notre modèle (Figure 81). Cependant ce rôle plus en amont serait plus important dans le photo-contrôle strict du débourrement car ce miARN est réprimé dans la comparaison t6L vs t6D. Sa répression à l'obscurité permettrait la levée de la répression de *DCL1* et donc permettrait une augmentation de la quantité de protéine DCL1 ce qui permettrait d'augmenter la biogénèse de miARNs impliqués dans la répression du débourrement afin de maintenir le blocage du débourrement à l'obscurité.

Le miR319b_1, en plus d'être réprimé dans la comparaison t6L vs t6D, est également réprimé dans la comparaison t0 vs t6D (Figure 81 éclair noir avec une croix rouge). Ce miARN serait répresseur de gènes activateurs du débourrement, et son action semble sous photo-contrôle.

Egalement, le miR160 et 319a_1 sont surexprimés à l'obscurité (t6D) par rapport à t0 (éclair noir, Figure 81).

Le miR160 cible des facteurs de transcription impliqués dans la signalisation de l'auxine (ARF), hormone inhibitrice du débourrement. Ce miARN pourrait participer à l'inhibition du débourrement via la signalisation auxinique (Xie et al., 2010 ; Huang et al., 2016). Par ailleurs, miR319 est réprimé dans des bourgeons en débourrement chez le thé ou la canne à sucre (Ortiz-Morea et al., 2016 ; Liu et al., 2019a). Ces données de la littérature confirment donc le potentiel rôle d'inhibiteurs du débourrement des miR160 et 319a_1. Cependant, cela n'est pas concordant avec le profil d'expression du miR319b_1. Ceci suggère qu'au sein de la famille miR319, des membres ont des rôles différents dans le contrôle du débourrement. Nous pouvons conclure que les miR160 et 319a_1 étant surexprimés dans la comparaison t0 vs t6D, pourraient avoir un rôle inhibiteur du débourrement par la répression de gènes activateur du débourrement.

Enfin, il semble exister un grand réseau de régulation entre HY5 et les miARNs. En effet, nous avons pu voir dans le chapitre I que ce facteur de transcription (FT) pourrait jouer un rôle dans le contrôle du débourrement, celui-ci étant réprimé 6 heures après décapitation.

Ce FT interagit avec d'autres acteurs importants dans le contrôle du débourrement comme l'auxine, les brassinostéroïdes et les sucres (Ang et al., 1998 ; Abbas et al., 2014 ; Chen et al., 2016b ; Ganpapa et Botto, 2016 ; Bhagat et al., 2021). De plus, il a été montré que la protéine TCP2 d'*Arabidopsis* est sous photo-contrôle et est capable de réguler positivement *HY5* (He et al., 2016). Le gène *TCP2* étant cible du miR319, cela serait concordant avec l'expression du miR319a_1 dans les bourgeons de rosier qui est surexprimé à t6D par rapport à t6L. Ainsi, la surexpression du miR319a_1 entraînerait la répression de l'expression du gène *TCP2* et la diminution de la quantité de protéine TCP2. Ceci aurait pour conséquence une réduction de l'induction de *HY5* par TCP2. Par ailleurs, HY5 a été rapporté comme contrôlant directement l'expression de plusieurs gènes *MIARN* chez *Arabidopsis* (Zhang et al., 2011). En effet, la protéine se lie dans la région promotrice des gènes *miR156d*, *miR172b*, *miR402*, *miR755*, *miR858*, *miR869* et *miR1888* et induit leur expression.

Identification de nouveaux gènes cibles des miARNs différentiellement exprimés.

Par la suite, nous avons recherché par approche *in silico* chez le rosier, les gènes cibles de ces 7 miARNs différentiellement exprimés dans nos différentes comparaisons. Au total, 159 gènes sont potentiellement régulés par au moins l'un de ces 7 miARNs. La recherche de corrélations négatives entre les expressions du miARN et de son (ses) gène(s) cible(s) nous a permis de sélectionner 33 couples miARN/gène cible qui pourraient avoir un rôle biologique effectif. Les gènes cibles de ces couples sont impliqués dans des processus connus du débourrement comme les signalisations hormonales ou le métabolisme des sucres mais également impliqués dans des processus encore non étudiés dans le contrôle du débourrement tel que le métabolisme des lipides. Notamment, le couple miR319/*PDB1* a été identifié. MiR319b_1 est surexprimé 6 heures après la décapitation à l'obscurité alors que le gène *PDB1* est réprimé. Cependant, comme la validation par qPCR a été réalisée mais n'a pas permis de confirmer cette dynamique d'expressions opposées de ce couple. Néanmoins, la corrélation négative d'expression identifiée dans notre séquençage entre ce miARN et son gène cible renforce l'intérêt d'étudier plus en détail ce couple dans le contrôle et du photo-contrôle du débourrement.

Les données de la littérature suggèrent que le métabolisme des lipides joue un rôle dans le développement architectural de la plante et le contrôle du débourrement. Ainsi, une surexpression du transporteur *BnFAX6* entraîne une augmentation de la ramification chez *Brassica napus* (Huang et al., 2021). Ce transporteur agirait comme une molécule-signal dans la dominance apicale car la décapitation entraînerait une remobilisation du flux de produits carbonés provenant de la photosynthèse vers la biosynthèse d'acides gras.

De plus, une perte de fonction du gène *DGD*, impliqué dans la voie des glycerolipides, entraîne un phénotype de type *dwarf* avec un fort retard de croissance et une inflorescence très petite et peu développée (Yu et al., 2020).

Également, parmi ces 33 couples, les couples miR319/*TCP*, miR396/*GRF* et miR319/*PBD1* sont particulièrement intéressants. Les deux premiers couples font intervenir des gènes impliqués dans la morphogenèse foliaire, l'expansion et la division cellulaire, processus associés au débourrement d'un bourgeon. Ces deux couples ont fait l'objet d'une validation fonctionnelle chez *Arabidopsis*. Les lignées surexprimant les pre-miARNs de rosier présentent des phénotypes architecturaux intéressants. En effet, les lignées d'*Arabidopsis* transgéniques ayant une forte accumulation de pre-miR319a_1 de rosier ont un nombre de feuilles de rosettes et de paraclades de rosettes significativement réduit. De plus, les feuilles de rosettes ont un aspect très découpé, similaire à ce qui a déjà été observé chez la lignée surexprimant le pre-miR319a d'*Arabidopsis*, *jawD* (Palatnik et al., 2003).

A l'inverse, il ne semble pas y avoir de réponse homogène des lignées ayant une forte accumulation de pre-miR396a-5p. En effet, la lignée 35S::396a-5p/F2 présente un phénotype qui se caractérise par un retard de montaison alors que les deux autres lignées ont plutôt une montaison plus précoce et une augmentation du nombre de paraclades de rosette. A l'inverse, la lignée 35S::396a-5p/E6 a une réduction significative du nombre de paraclades de rosette alors que la lignée 35S::396a-5p/B2 ne se distingue pas de la lignée sauvage. Le phénotype de la lignée 35S:.396a-5p/F2 a un phénotype inverse à celui des lignées rGRF2 et MIM396 d'*Arabidopsis*. La lignée 35S::396a-5p/B2 se caractérise également par une réduction du nombre de paraclades caulinaires sur l'axe principal.

Il est difficile de conclure pour le moment sur l'effet du miR396 sur le débourrement chez *Arabidopsis*. Afin de répondre à cela, et pour mieux caractériser les lignées 35S::pre-miR319, nous pourrions réaliser de nouveau leurs phénotypages en plaçant cette fois-ci les plantes en jours courts puis en jours longs afin de mieux synchroniser le développement des plantes. Une étude plus fine de la cinétique de débourrement et un comptage du nombre de ramifications émises au cours du temps permettra de mieux discriminer les phénotypes. Nous pouvons aussi analyser d'autres lignées indépendantes portant la même construction afin de confirmer les phénotypes observés.

Quel que soit le pre-miARN de rosier surexprimé chez *Arabidopsis*, nous n'observons pas d'effet clair sur le débourrement chez *Arabidopsis*. Cela pourrait être expliqué par la nécessité de conserver la dynamique d'expression native du miARN chez le rosier afin de maintenir sa fonction dans le contrôle du débourrement. Or ici, les pre-miARNs de rosier sont sous promoteur fort 35S et non sous le contrôle de leur propre promoteur, pouvant modifier ainsi leur mode de régulation.

Nous pouvons aussi envisager que la fonction du miARN de rosier dans le contrôle du débourrement dépende d'un gène cible spécifique rosier absent chez *Arabidopsis*, ce qui expliquerait pourquoi nous n'observons pas de phénotype lié au débourrement. Pour contrecarrer ce problème lié au modèle utilisé, il faudrait étudier l'effet de la surexpression du miARN ou de son inactivation directement chez le rosier par transformation ou édition de génome.

En conclusion, la régulation post-transcriptionnelle par les miARNs semble jouer un rôle dans le contrôle du débourrement chez le rosier. Sept miARNs sont différentiellement exprimés dans les phases précoces du débourrement. Les miR396a-5p et 396b présentent un effet suite à la levée de la dominance apicale après décapitation. Ces miARNs seraient capables de cibler des gènes impliqués dans le métabolisme de certains acides aminés ainsi que des gènes impliqués dans les processus traductionnels. Il a été montré l'implication de l'asparagine dans le contrôle du débourrement chez le rosier (Le Moigne et al., 2018), nous pouvons supposer que d'autres acides aminés pourraient eux aussi jouer un rôle dans ce processus.

Notre analyse montre que les 5 autres miR160, miR162a-3p, miR166u, miR319a_1 et miR319b_1 sont différentiellement exprimés au cours des 6 premières heures au cours du débourrement, en fonction de la condition d'éclairement. Ces miARNs seraient capables de cibler des gènes impliqués dans des processus bien décrits du débourrement (signalisations hormonales, métabolisme des sucres, métabolisme des ROS, transduction du signal lumineux, reprise du cycle cellulaire). Notre étude met aussi en évidence l'implication de processus peu décrits dans ce contexte: métabolisme des lipides et métabolisme des acides aminés. Ces miARNs ainsi que leurs gènes cibles forment des couples intéressants dans l'étude des régulations post-transcriptionnelles du photo-contrôle du débourrement.

L'étude de la cinétique d'expression des miARNs tout au long du débourrement permettra d'enrichir notre compréhension du rôle de ces miARNs. En effet, chez *Arabidopsis*, il a été montré que certains miARNs comme miR156 et miR172 ne s'expriment qu'à un certain stade de développement de la plante afin d'assurer la transition de phases juvéniles à adulte. Ainsi, le miR156 est de moins en moins exprimé vers la phase adulte alors que l'expression du miR172 augmente tout au long de la phase reproductive (Zhu et Helliwell, 2010 ; Wang et Wang, 2015). De telles régulations temporelles de l'expression des miARNs tout au long du débourrement seraient également envisageables.

Perspectives

Etude du rôle des miARNs candidats dans le contrôle du débourrement par transformation chez le rosier

Lorsque, dans nos travaux, les pre-miR319 et 396 ont été fortement surexprimés chez *Arabidopsis*, nous n'avons pas observé d'effet sur le contrôle du débourrement. Les deux espèces *Arabidopsis* et rosier ne présentent pas un même photo-contrôle du débourrement (Girault et al., 2008). Les bourgeons d'*Arabidopsis* débourrent à l'obscurité alors que ceux de rosier sont complètement bloqués par l'absence de lumière (Girault et al., 2008). Egalement, nous pouvons émettre l'hypothèse que lorsqu'un miARN de rosier est transféré dans un système hétérologue, seul, sans tout son réseau de régulation, notamment celui lié au photo-contrôle, les réponses observées sont vraisemblablement biaisées et ne reflètent pas toute la réalité de l'action du miARN. En effet, sans la régulation subie par son promoteur propre, la dynamique d'expression du miARN est modifiée. Il a été montré que les miR156 et miR172 sont exprimés pendant des phases de développement précises afin d'assurer la transition phase juvénile à la phase adulte (Zhu et Helliwell, 2010 ; Wang et Wang, 2015). Nous pouvons penser que le miARN doit être exprimé à un temps précis du débourrement afin d'avoir son effet.

Afin de pallier ce manque d'expression native du miARN, nous pourrions regarder l'effet du miARN sur le débourrement via l'étude de ses gènes cibles chez *Arabidopsis*. Dans le chapitre IV, nous avions analysé le phénotype d'une lignée portant le gène cible AthTCP4 résistant au miR319, la lignée soj8. Nous n'avions pas remarqué d'effet sur le débourrement chez cette lignée. Nous ne pouvons écarter l'hypothèse que l'effet du miARN passe par d'autres gènes cibles que les gènes déjà connus. Nous avons identifié dans le chapitre III de nouveaux gènes cibles potentiels de la famille miR319. Nous pourrions étudier le phénotype de ces nouveaux gènes cibles (comme *PDB1* ou *M6PI*) résistant au miR319 chez le rosier et voir l'effet du miARN sur le débourrement chez *Arabidopsis* en comparant le phénotype avec des lignées d'*Arabidopsis* transformées avec le gène cible de rosier non résistant au miARN.

Il serait également intéressant d'étudier le rôle des miARNs dans le contrôle du débourrement directement chez le rosier. Ceci pourrait se faire par l'étude du phénotype d'un mutant perte-de-fonction du miARN ou bien par l'étude d'une lignée exprimant un gène cible résistant au miARN. L'étude de la perte-de-fonction du miARN nous permettrait de connaître l'effet du miARN sur le contrôle du débourrement par la levée de la répression de ses gènes cibles. Pour cela, nous pourrions réaliser un transcriptome de ce mutant et identifier les gènes surexprimés chez ce mutant. Nous pourrions considérer que les gènes surexprimés seraient potentiellement cibles du miARN en question.

Concernant l'étude d'un mutant gène cible résistant, cela nous permettrait d'étudier le rôle du couple formé par le miARN d'intérêt avec ce gène cible spécifique dans le contrôle du débourrement.

Ces approches nécessitent la maîtrise de la transformation génétique du rosier qui reste difficile et longue. C'est pour cette raison qu'au cours de cette thèse, nous avons fait le choix de ne pas utiliser cette approche. Toutefois à plus long terme, et afin d'obtenir des lignées de rosier perte-de-fonction de ces miARNs, il serait possible d'utiliser la technique CRISPR-Cas9. Cette technique a en effet permis d'obtenir et d'étudier chez *Arabidopsis* des mutants de la famille miR172 allant de mutants simples à des quintuples mutants (Ó'Maoiléidigh et al., 2021). Malgré le fait que le rosier reste difficilement transformable, cette technique est actuellement testée sur le rosier au sein de l'IRHS (Phénotype en cours d'étude, Equipe GDO).

Enfin, l'utilisation de mutant STTM (Short Tandem Target Mimic) pour être intéressant pour étudier le rôle de miARNs dans le contrôle du débourrement. En effet, l'étude de lignée STTM des miR156/157 et 165/166 chez *Arabidopsis* ainsi que chez la tomate ont permis de mettre en évidence le rôle de ces miARNs dans la biosynthèse et l'activation d'hormones ainsi que sur le métabolisme secondaire (Peng et al., 2018). L'utilisation de mutant STTM chez le rosier serait intéressante afin de comprendre le rôle de miARNs dans le contrôle du débourrement.

Interactions entre miARNs et facteurs endogènes du contrôle du débourrement.

Il a été montré que les miARNs peuvent être régulés par des apports exogènes de solutions d'hormones pulvérisées sur plantes entières (Han et al., 2014 ; Zhao et al., 2019) ou par des apports de sucres sur des plantes cultivées *in vitro* (Yang et al., 2013). Sachant que les hormones et les sucres ont un rôle important dans le contrôle du débourrement, nous pourrions réaliser de tels apports exogènes d'hormones ou de sucres sur rosier afin d'étudier l'expression des miARNs en réponse à ces effecteurs. De tels apports exogènes ont déjà été réalisés avec succès sur des bourgeons de rosier *in planta* (Roman et al., 2016 ; Corot et al.,2017) et isolés *in vitro* (Barbier et al., 2015 ; Bertheloot et al., 2020 ; Wang et al., 2021a). Les ROS ayant un rôle important dans le contrôle du débourrement (Porcher et al., 2020 ; Porcher et al., 2021), ces expériences pourraient également être réalisées pour comprendre l'interaction entre le métabolisme oxydatif et les miARNs par les mêmes méthodes utilisées pour l'apport d'hormones ou de sucres.

Ces expériences permettront de mieux comprendre le réseau de régulation entre miARN et facteurs endogènes du débourrement. Il pourrait notamment y avoir des boucles de rétro-régulation entre miARN et hormones. Il a été montré notamment que miR160 réprime des gènes codants des facteurs de transcription impliqués dans la signalisation de l'auxine (*ARF* ; Huang et al., 2016), nous pouvons nous poser la question si l'auxine peut également réguler l'expression du miR160 afin d'établir une boucle de régulation chez le rosier ? De plus, sachant que le saccharose peut moduler l'expression de certains miARNs (Wang et al., 2020a) et que nous avons montré dans le chapitre II que miR8175 et miR166e-5p seraient capables de cibler des gènes impliqués dans le métabolisme des sucres (*RhSUSY* et *Rh6PFK* respectivement), nous pouvons supposer l'existence de boucles de régulation entre sucres et miARNs dans les bourgeons de rosier.

SiARNs et autres petits ARNs sont-ils impliqués dans le contrôle du débourrement ?

Des régulations post-transcriptionnelles autres que celles faisant intervenir les miARNs peuvent jouer un rôle dans le contrôle du débourrement. En effet, des études ont mis en évidence le possible rôle de petits ARNs interférents (siARNs ou tasiARNs) dans ce processus (Ortiz-Morea et al., 2013). De plus, dans notre séquençage de petits ARNs, nous avons identifié un fort nombre de siARNs différentiellement exprimés au cours du débourrement (un total de 250 siARNs différentiellement exprimés dans les trois comparaisons). Il sera intéressant d'en étudier plus précisément leurs rôles.

Enfin, il a été montré dans la littérature, une interaction entre miARN et siARN. En effet, parmi les précurseurs de tasiARNs identifiés chez *Arabidopsis*, le clivage par *TAS3* nécessite la formation d'un complexe avec le miR390 et la protéine ARGONAUTE 7 (AGO7) (Montgomery et al., 2008). En particulier, l'induction du miR390 lors de l'initiation des racines latérales chez *Arabidopsis* déclenche la production locale de tasiARNs. Des tasiARNs provenant du précurseurs TAS3 répriment l'activité des gènes *ARF2, ARF3* et *ARF4*, ce qui permet l'induction de la croissance des racines latérales. De plus, les gènes *ARF2, ARF3* et *ARF4* sont nécessaires pour l'expression propre du miR390 au travers de diverses boucles de régulation. L'auxine, le miR390, TAS3 et les ARFs forment donc un réseau de régulation contrôlant le développement des racines latérales chez *Arabidopsis* (Marin et al., 2010).

Le module miR390/TAS3 est également important dans d'autres processus. Les tasiARNs ciblant des ARFs (tasiARFs) suppriment la transition de la phase juvénile à la phase adulte chez *Arabidopsis* et sont nécessaires pour le développement et la polarité des feuilles chez *Lotus japonicus* ou *Medicago truncatula* (Adenot et al., 2006 ; Fahlgren et al., 2006 ; Garcia et al., 2006 ; Zhou et al., 2013a ; Hobecker et al., 2017). Le module miR390/TAS3 a été identifié dans des bourgeons axillaires de canne à sucre (Ortiz-Morea et al., 2013). Ce module pourrait donc avoir un rôle dans le contrôle du débourrement par la régulation de la signalisation de l'auxine et de la néo-organogénèse des feuilles se développant au cours du débourrement.
Dans ce but, de futures recherches devraient être conduites afin d'identifier quels petits ARNs sont impliqués et comment ils interagissent avec les miARNs dans le contrôle du débourrement.

Les micro-peptides, molécules à fort potentiel dans l'étude du contrôle du débourrement par les miARNs.

Il a été montré que les pri-miARNs contiennent dans leur partie 5' un petit cadre ouvert de lecture (ORF, Open Reading Frame) qui code un petit peptide appelé micro-peptide (miPEP). Ces miPEPs peuvent augmenter le niveau de miARNs matures en induisant la transcription du miARN primaire (Lauressergues et al., 2015). Les miPEPs ont été identifiés chez les plantes (comme *Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula*, *Glycine max*) et également chez les animaux (Lauressergues et al., 2015 ; Couzigou et al., 2015 ; Couzigou et al., 2016 ; Couzigou et al., 2017 ; Prel et al., 2021 ; Montigny et al., 2021). Chez les plantes, les miPEPs semblent être très spécifiques car ils induisent leur gène *MiARN* associé, sans perturber l'expression d'autres gènes *MiARNs*, même au sein de la même famille (Sharma et al., 2020 ; Lauressergues et al., 2022).

Ainsi des plantes traitées avec des miPEPs synthétiques ont un phénotype ressemblant aux phénotypes surexprimant les miARNs (Couzigou et al., 2015 ; Lauressergues et al., 2015). Par exemple, l'application du miPEP172c stimule l'expression de *MiR172c* et cette surexpression réprime le facteur de transcription *NODULE NUMBER CONTROL 1* (*NNC1*). Au total, ce traitement augmente la nodulation chez le soja (Couzigou et al., 2016). Chez *Medicago truncatula,* une réduction du développement des racines latérales et une stimulation de la croissance de la racine principale a été obtenue après traitement avec les miPEPs synthétiques, miPEP171b et 165a (Lauressergues et al., 2015).

Nous avons identifié un certain nombre de miARNs au cours de cette thèse présentant un rôle intéressant dans le contrôle du débourrement. Nous pourrions nous demander si les gènes dont ils sont issus comptent au sein de leur séquence 5' UTR ce type de petits cadres de lecture. Nous ne pouvons pas écarter cette possibilité. Cependant, l'annotation du génome de *Rosa chinensis* ne permet d'identifier actuellement que la séquence des pre-miARNs.

Pour identifier une ORF associée à cette séquence, nous devrons rechercher en amont de ces pre-miARNs (environ 500 à 1000 nucléotides en amont de la séquence du pre-miARN), un ou des cadre(s) ouvert(s) de lecture sur une des trois phases de lecture. Une fois identifiés et synthétisés, ces miPEPs pourraient être appliqués sur les bourgeons de rosier par les méthodes *in planta* et *in vitro* mises au point dans l'équipe afin d'étudier leurs effets sur le débourrement et la synthèse de leurs miARNs associés.

Intérêts des approches petits ARNs et miPEPs pour des applications agronomiques

La compréhension des mécanismes liés au contrôle du débourrement par les miARNs et des siARNs présente une réelle opportunité d'améliorer des caractères agronomiques importants tels que l'architecture des plantes, le rendement ou le développement racinaire (Couzigou et al., 2016). En effet, il a été montré qu'un traitement par miPEPs synthétiques permet l'augmentation de la nodulation chez le soja (Couzigou et al., 2016) ainsi qu'une stimulation de la croissance de la racine principale chez *Medicago truncatula* (Lauressergues et al., 2015). Plus en lien avec notre problématique, une irrigation contenant un "cocktail" de 23 miPEPs régule la ramification racinaire chez *Arabidopsis* (Ormancey et al., 2021). Ces résultats suggèrent que l'utilisation des miPEPs peut avoir un intérêt agronomique et pourrait donc apporter des alternatives aux intrants chimiques.

De plus, des essais de pulvérisation de solutions contenant des siARNs ont été menés afin d'induire l'extinction de gènes cibles (gene silencing induced). Il a été montré que l'utilisation de l'interférence par ARN (RNAi) est efficace dans le contrôle des pathogènes comme les virus, bactéries, et champignons, tout comme les insectes et nématodes (Song et al., 2018 ; Rank et Koch, 2021). Par exemple, des plants de blé (*Triticum aestivum*) sont traités par "spray" ARN contenant des siARNs ciblant et entrainant l'extinction du gène *MYOSIN5* qui va empêcher la croissance mycellaire et réduire la virulence des champignons pathogènes *Fusarium* spécifiquement (Song et al., 2018).

Enfin, l'utilisation de mutant STTM s'est avérée utile dans l'étude des miARNs impliqués dans le contrôle de traits agronomiques chez le riz. A ce jour, des lignées transgéniques STTM ont été obtenues sur une douzaine de familles de miARNs et plusieurs d'entre elles présentent des phénotypes liés à des caractères agronomiques (comme la fertilité, taille de la plante, nombre de talles) et aux réponses aux stress sécheresse et salin (Chen et al., 2021). L'utilisation de ces lignées pour être réalisées sur le rosier afin de cultiver des mutants présentant un phénotype intéressant de ramification pour la production de rosier.

En conclusion, par l'identification de miARNs et siARNs potentiellement impliqués dans le contrôle du débourrement grâce à notre séquençage, ces techniques pourraient être utilisées pour comprendre le rôle de ces petits ARNs dans le contrôle du débourrement. Ces techniques pourront également être utilisées à long terme afin de pouvoir moduler l'architecture et le débourrement des plantes dans des conditions de culture à grande échelle.

Bibliographie

Abbas, N., Maurya, J. P., Senapati, D., Gangappa, S. N., and Chattopadhyay, S. (2014). Arabidopsis CAM7 and HY5 physically interact and directly bind to the HY5 promoter to regulate its expression and thereby promote photomorphogenesis. *Plant Cell* 26, 1036–1052. doi:10.1105/tpc.113.122515.

Abeles, F. B. (1973). *Ethylene in Plant Biology*. Academic Press.

Abidi, F., Girault, T., Douillet, O., Guillemain, G., Sintes, G., Laffaire, M., et al. (2013). Blue light effects on rose photosynthesis and photomorphogenesis: Blue light and rose development. *Plant Biology* 15, 67–74. doi:10.1111/j.1438-8677.2012.00603.x.

Adenot, X., Elmayan, T., Lauressergues, D., Boutet, S., Bouché, N., Gasciolli, V., et al. (2006). DRB4-dependent TAS3 trans-acting siRNAs control leaf morphology through AGO7. *Curr Biol* 16, 927–932. doi:10.1016/j.cub.2006.03.035.

Agrios Plant Pathology - 5th Edition. Available at: https://www.elsevier.com/books/plant-pathology/agrios/978-0-08-047378-9 [Accessed April 7, 2022].

Aguilar-Martínez, J. A., Poza-Carrión, C., and Cubas, P. (2007). *Arabidopsis BRANCHED1* Acts as an Integrator of Branching Signals within Axillary Buds. *The Plant Cell* 19, 458–472. doi:10.1105/tpc.106.048934.

Aida, M., Ishida, T., and Tasaka, M. (1999). Shoot meristem and cotyledon formation. 8.

Andrews, S., Krueger, F., Segonds-Pichon, A., Biggins, L., Krueger, C., and Wingett, S. (2010). FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data.

Ang, L. H., Chattopadhyay, S., Wei, N., Oyama, T., Okada, K., Batschauer, A., et al. (1998). Molecular interaction between COP1 and HY5 defines a regulatory switch for light control of Arabidopsis development. *Mol Cell* 1, 213–222. doi:10.1016/s1097-2765(00)80022-2.

Anna, B.-B., Grzegorz, B., Marek, K., Piotr, G., and Marcin, F. (2019). Exposure to High-Intensity Light Systemically Induces Micro-Transcriptomic Changes in Arabidopsis thaliana Roots. *IJMS* 20, 5131. doi:10.3390/ijms20205131.

Arite, T., Iwata, H., Ohshima, K., Maekawa, M., Nakajima, M., Kojima, M., et al. (2007). DWARF10, an RMS1/MAX4/DAD1 ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. *Plant J* 51, 1019–1029. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03210.x.

Aronsson, H. (2008). The galactolipid monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) contributes to photosynthesis-related processes in Arabidopsis thaliana. *Plant Signaling & Behavior* 3, 1093–1095. doi:10.4161/psb.3.12.6908.

Aung, B., Gruber, M. Y., Amyot, L., Omari, K., Bertrand, A., and Hannoufa, A. (2015). MicroRNA156 as a promising tool for alfalfa improvement. *Plant Biotechnol J* 13, 779–790. doi:10.1111/pbi.12308.

Avonce, N., Leyman, B., Mascorro-Gallardo, J. O., Van Dijck, P., Thevelein, J. M., and Iturriaga, G. (2004). The Arabidopsis Trehalose-6-P Synthase AtTPS1 Gene Is a Regulator of Glucose, Abscisic Acid, and Stress Signaling. *Plant Physiology* 136, 3649–3659. doi:10.1104/pp.104.052084.

Axtell, M. J. (2013). Classification and Comparison of Small RNAs from Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 137–159. doi:10.1146/annurev-arplant-050312-120043.

Bach-Pages, M., Homma, F., Kourelis, J., Kaschani, F., Mohammed, S., Kaiser, M., et al. (2020). Discovering the RNA-Binding Proteome of Plant Leaves with an Improved RNA Interactome Capture Method. *Biomolecules* 10, 661. doi:10.3390/biom10040661.

Baek, D., Kim, M. C., Chun, H. J., Kang, S., Park, H. C., Shin, G., et al. (2012). Regulation of *miR399f* Transcription by AtMYB2 Affects Phosphate Starvation Responses in Arabidopsis. *Plant Physiology* 161, 362–373. doi:10.1104/pp.112.205922.

Balla, J., Kalousek, P., Reinöhl, V., Friml, J., and Procházka, S. (2011). Competitive canalization of PIN-dependent auxin flow from axillary buds controls pea bud outgrowth. *The Plant Journal* 65, 571–577. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04443.x.

Barbier, F., Péron, T., Lecerf, M., Perez-Garcia, M.-D., Barrière, Q., Rolčík, J., et al. (2015). Sucrose is an early modulator of the key hormonal mechanisms controlling bud outgrowth in Rosa hybrida. *Journal of Experimental Botany* 66, 2569–2582. doi:10.1093/jxb/erv047.

Barbier, F., Chabikwa, T. G., Ahsan, M. U., Cook, S. E., Powell, R., Tanurdzic, M., et al. (2019a). A phenol/chloroform-free method to extract nucleic acids from recalcitrant, woody tropical species for gene expression and sequencing. *Plant Methods* 15, 62. doi:10.1186/s13007-019-0447-3.

Barbier, F., Dun, E. A., Kerr, S. C., Chabikwa, T. G., and Beveridge, C. A. (2019b). An Update on the Signals Controlling Shoot Branching. *Trends in Plant Science* 24, 220–236. doi:10.1016/j.tplants.2018.12.001.

Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 116, 281–297. doi:10.1016/S0092-8674(04)00045-5.

Beauvieux, R., Wenden, B., and Dirlewanger, E. (2018). Bud Dormancy in Perennial Fruit Tree Species: A Pivotal Role for Oxidative Cues. *Frontiers in Plant Science* 9. Available at: https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2018.00657.

Bell, E. M., Lin, W., Husbands, A. Y., Yu, L., Jaganatha, V., Jablonska, B., et al. (2012). Arabidopsis LATERAL ORGAN BOUNDARIES negatively regulates brassinosteroid accumulation to limit growth in organ boundaries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 21146–21151. doi:10.1073/pnas.1210789109.

Benlloch, R., Berbel, A., Ali, L., Gohari, G., Millán, T., and Madueño, F. (2015). Genetic control of inflorescence architecture in legumes. *Frontiers in Plant Science* 6. Available at: https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2015.00543.

Bennett, T., and Leyser, O. (2006). Something on the Side: Axillary Meristems and Plant Development. *Plant Mol Biol* 60, 843–854. doi:10.1007/s11103-005-2763-4.

Bennett, T., Sieberer, T., Willett, B., Booker, J., Luschnig, C., and Leyser, O. (2006). The Arabidopsis MAX Pathway Controls Shoot Branching by Regulating Auxin Transport. *Current Biology* 16, 553–563. doi:10.1016/j.cub.2006.01.058.

Berger, Y., Harpaz-Saad, S., Brand, A., Melnik, H., Sirding, N., Alvarez, J. P., et al. (2009). The NAC-domain transcription factor GOBLET specifies leaflet boundaries in compound tomato leaves. *Development* 136, 823–832. doi:10.1242/dev.031625.

Bertheloot, J., Barbier, F., Boudon, F., Perez-Garcia, M. D., Péron, T., Citerne, S., et al. (2020). Sugar availability suppresses the auxin-induced strigolactone pathway to promote bud outgrowth. *New Phytologist* 225, 866–879. doi:10.1111/nph.16201.

Berthet, S., Demont-Caulet, N., Pollet, B., Bidzinski, P., Cézard, L., Le Bris, P., et al. (2011). Disruption of *LACCASE4* and *17* Results in Tissue-Specific Alterations to Lignification of *Arabidopsis thaliana* Stems. *The Plant Cell* 23, 1124–1137. doi:10.1105/tpc.110.082792.

Beveridge, C. A., Symons, G. M., Murfet, I. C., Ross, J. J., and Rameau, C. (1997). The rms1 Mutant of Pea Has Elevated Indole-3-Acetic Acid Levels and Reduced Root-Sap Zeatin Riboside Content but Increased Branching Controlled by Graft-Transmissible Signal(s). *Plant Physiol* 115, 1251–1258.

Beveridge, C. A., Symons, G. M., and Turnbull, C. G. N. (2000). Auxin Inhibition of Decapitation-Induced Branching Is Dependent on Graft-Transmissible Signals Regulated by Genes *Rms1* and *Rms2*. *Plant Physiology* 123, 689–698. doi:10.1104/pp.123.2.689.

Bhagat, P., Verma, D., Sharma, D., and Sinha, A. (2021). HY5 and ABI5 transcription factors physically interact to fine tune light and ABA signaling in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* 107. doi:10.1007/s11103-021-01187-z.

Blein, T., and Laufs, P. (2016). "MICRORNAS (MIRNAS) and Plant Development," in *eLS*, ed.John Wiley & Sons, Ltd (Wiley), 1–11. doi:10.1002/9780470015902.a0020106.pub2.

Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M., and Benning, C. (1998). AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *EMBO J* 17, 170–180. doi:10.1093/emboj/17.1.170.

Bonicel, A., Haddad, G., and Gagnaire, J. (1987). Seasonal variations of starch and major soluble sugars in the different organs of young poplars. *Plant Physiology and Biochemistry (France)*.

Booker, J., Auldridge, M., Wills, S., McCarty, D., Klee, H., and Leyser, O. (2004). MAX3/CCD7 Is a Carotenoid Cleavage Dioxygenase Required for the Synthesis of a Novel Plant Signaling Molecule. *Current Biology* 14, 1232–1238. doi:10.1016/j.cub.2004.06.061.

Booker, J., Sieberer, T., Wright, W., Williamson, L., Willett, B., Stirnberg, P., et al. (2005). MAX1 encodes a cytochrome P450 family member that acts downstream of MAX3/4 to produce a carotenoid-derived branch-inhibiting hormone. *Dev Cell* 8, 443–449. doi:10.1016/j.devcel.2005.01.009.

Borchert, R., and Rivera, G. (2001). Photoperiodic control of seasonal development and dormancy in tropical stem-succulent trees. *Tree Physiology* 21, 213–221. doi:10.1093/treephys/21.4.213.

Boudière, L., Michaud, M., Petroutsos, D., Rébeillé, F., Falconet, D., Bastien, O., et al. (2014). Glycerolipids in photosynthesis: Composition, synthesis and trafficking. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1837, 470–480. doi:10.1016/j.bbabio.2013.09.007.

Boumaza, R., Demotes-Mainard, S., Huche-Thelier, L., and Guerin, V. (2009). Visual Characterization of the Esthetic Quality of the Rosebush. *Journal of Sensory Studies* 24, 774–796. doi:10.1111/j.1745-459X.2009.00238.x.

Boumaza, R., Huché-Thélier, L., Demotes-Mainard, S., Coz, E. L., Leduc, N., Pelleschi-Travier, S., et al. (2010). Sensory profiles and preference analysis in ornamental horticulture: The case of the rosebush. *Food Quality and Preference* 21, 987–997. doi:10.1016/j.foodqual.2010.05.003.

Braun, N., de Saint Germain, A., Pillot, J.-P., Boutet-Mercey, S., Dalmais, M., Antoniadi, I., et al. (2012). The Pea TCP Transcription Factor PsBRC1 Acts Downstream of Strigolactones to Control Shoot Branching. *Plant Physiology* 158, 225–238. doi:10.1104/pp.111.182725.

Breakfield, N. W., Corcoran, D. L., Petricka, J. J., Shen, J., Sae-Seaw, J., Rubio-Somoza, I., et al. (2012). High-resolution experimental and computational profiling of tissue-specific known and novel miRNAs in Arabidopsis. *Genome Res.* 22, 163–176. doi:10.1101/gr.123547.111.

Brewer, P. B., Dun, E. A., Ferguson, B. J., Rameau, C., and Beveridge, C. A. (2009). Strigolactone Acts Downstream of Auxin to Regulate Bud Outgrowth in Pea and Arabidopsis. *Plant Physiology* 150, 482–493. doi:10.1104/pp.108.134783.

Budak, H., and Akpinar, B. A. (2015). Plant miRNAs: biogenesis, organization and origins. *Funct Integr Genomics* 15, 523–531. doi:10.1007/s10142-015-0451-2.

Campbell, M. A., Suttle, J. C., and Sell, T. W. (1996). Changes in cell cycle status and expression of p34cdc2 kinase during potato tuber meristem dormancy. *Physiologia Plantarum* 98, 743–752. doi:10.1111/j.1399-3054.1996.tb06680.x.

Carvalho, S. A., Gazengel, K., Bretaudeau, A., Robin, S., Daval, S., and Legeai, F. (2021). AskoR, A R Package for Easy RNASeq Data Analysis. in, 1. doi:10.3390/IECE-10646.

Challa, K. R., Aggarwal, P., and Nath, U. (2016). Activation of YUCCA5 by the Transcription Factor TCP4 Integrates Developmental and Environmental Signals to Promote Hypocotyl Elongation in Arabidopsis. *Plant Cell* 28, 2117–2130. doi:10.1105/tpc.16.00360.

Chao, W. S., Foley, M. E., Horvath, D. P., and Anderson, J. V. Signals Regulating Dormancy in Vegetative Buds. 8.

Chapman, E. J., and Estelle, M. (2009). Mechanism of Auxin-Regulated Gene Expression in Plants. *Annual Review of Genetics* 43, 265–285. doi:10.1146/annurev-genet-102108-134148.

Chatfield, S. P., Stirnberg, P., Forde, B. G., and Leyser, O. (2000). The hormonal regulation of axillary bud growth in Arabidopsis. *Plant J* 24, 159–169. doi:10.1046/j.1365-313x.2000.00862.x.

Chávez Montes, R. A., Rosas-Cárdenas, de F. F., De Paoli, E., Accerbi, M., Rymarquis, L. A., Mahalingam, G., et al. (2014). Sample sequencing of vascular plants demonstrates widespread conservation and divergence of microRNAs. *Nat Commun* 5, 3722. doi:10.1038/ncomms4722.

Chen, H., and Xiong, L. (2008). Role of HY5 in abscisic acid response in seeds and seedlings. *Plant Signaling & Behavior* 3, 986–988. doi:10.4161/psb.6185.

Chen, J., Teotia, S., Lan, T., and Tang, G. (2021). MicroRNA Techniques: Valuable Tools for Agronomic Trait Analyses and Breeding in Rice. *Front Plant Sci* 12, 744357. doi:10.3389/fpls.2021.744357.

Chen, X. (2009). Small RNAs and their roles in plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25, 21–44. doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113417.

Chen, X. (2012). Small RNAs in development – insights from plants. *Current Opinion in Genetics & Development* 22, 361–367. doi:10.1016/j.gde.2012.04.004.

Chen, X., Xia, X., Guo, X., Zhou, Y., Shi, K., Zhou, J., et al. (2016a). Apoplastic H_2O_2 plays a critical role in axillary bud outgrowth by altering auxin and cytokinin homeostasis in tomato plants. *New Phytol* 211, 1266–1278. doi:10.1111/nph.14015.

Chen, X., Yao, Q., Gao, X., Jiang, C., Harberd, N. P., and Fu, X. (2016b). Shoot-to-Root Mobile Transcription Factor HY5 Coordinates Plant Carbon and Nitrogen Acquisition. *Current Biology* 26, 640–646. doi:10.1016/j.cub.2015.12.066.

Choe, S., Tanaka, A., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Ross, A. S., et al. (2000). Lesions in the sterol Δ7 reductase gene of Arabidopsis cause dwarfism due to a block in brassinosteroid biosynthesis. *The Plant Journal* 21, 431–443. doi:10.1046/j.1365-313x.2000.00693.x.

Choubane, D., Rabot, A., Mortreau, E., Legourrierec, J., Péron, T., Foucher, F., et al. (2012). Photocontrol of bud burst involves gibberellin biosynthesis in Rosa sp. *Journal of Plant Physiology* 169, 1271–1280. doi:10.1016/j.jplph.2012.04.014.

Chuck, G., Cigan, A. M., Saeteurn, K., and Hake, S. (2007). The heterochronic maize mutant Corngrass1 results from overexpression of a tandem microRNA. *Nat Genet* 39, 544–549. doi:10.1038/ng2001.

Cline, M. G. (1997). Concepts and terminology of apical dominance. *Am. J. Bot.* 84, 1064–1069. doi:10.2307/2446149.

Cline, M. G., and Oh, C. (2006). A Reappraisal of the Role of Abscisic Acid and its Interaction with Auxin in Apical Dominance. *Annals of Botany* 98, 891–897. doi:10.1093/aob/mcl173.

Clough, S. J., and Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana: Floral dip transformation of Arabidopsis. *The Plant Journal* 16, 735–743. doi:10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x.

Cluis, C. P., Mouchel, C. F., and Hardtke, C. S. (2004). The Arabidopsis transcription factor HY5 integrates light and hormone signaling pathways. *The Plant Journal* 38, 332–347. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02052.x.

Cooke, J. E. K., Eriksson, M. E., and Junttila, O. (2012). The dynamic nature of bud dormancy in trees: environmental control and molecular mechanisms: Bud dormancy in trees. *Plant, Cell & Environment* 35, 1707–1728. doi:10.1111/j.1365-3040.2012.02552.x.

Corot, A., Roman, H., Douillet, O., Autret, H., Perez-Garcia, M.-D., Citerne, S., et al. (2017). Cytokinins and Abscisic Acid Act Antagonistically in the Regulation of the Bud Outgrowth Pattern by Light Intensity. *Front. Plant Sci.* 8, 1724. doi:10.3389/fpls.2017.01724.

Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* 16, 10881–10890. doi:10.1093/nar/16.22.10881.

Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 850–861. doi:10.1038/nrm1746.

Cottignies, A., and Ennane, A. J. (1988). Water Content, Water Potential, and Transition from the Noncycling to the Cycling State in the Pea Cotyledonary Bud. *Journal of Plant Physiology* 132, 1–4. doi:10.1016/S0176-1617(88)80173-1.

Couzigou, J.-M., André, O., Guillotin, B., Alexandre, M., and Combier, J.-P. (2016). Use of microRNA-encoded peptide miPEP172c to stimulate nodulation in soybean. *New Phytologist* 211, 379–381. doi:10.1111/nph.13991.

Couzigou, J.-M., Lauressergues, D., André, O., Gutjahr, C., Guillotin, B., Bécard, G., et al. (2017). Positive Gene Regulation by a Natural Protective miRNA Enables Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Cell Host & Microbe* 21, 106–112. doi:10.1016/j.chom.2016.12.001.

Couzigou, J.-M., Lauressergues, D., Bécard, G., and Combier, J.-P. (2015). miRNA-encoded peptides (miPEPs): A new tool to analyze the roles of miRNAs in plant biology. *RNA Biology* 12, 1178–1180. doi:10.1080/15476286.2015.1094601.

Crespel, L., Le Bras, C., Amoroso, T., Unda Ulloa, M. G., Morel, P., and Sakr, S. (2020). Genotype × Light Quality Interaction on Rose Architecture. *Agronomy* 10, 913. doi:10.3390/agronomy10060913.

Cui, L., Zheng, F., Wang, J., Zhang, C., Xiao, F., Ye, J., et al. (2020). miR156a-targeted SBP-Box transcription factor SlSPL13 regulates inflorescence morphogenesis by directly activating SFT in tomato. *Plant Biotechnology Journal* 18, 1670–1682. doi:10.1111/pbi.13331.

Curaba, J., Talbot, M., Li, Z., and Helliwell, C. (2013). Over-expression of microRNA171 affects phase transitions and floral meristem determinancy in barley. *BMC Plant Biol* 13, 6. doi:10.1186/1471-2229-13-6.

Dai, X., Zhuang, Z., and Zhao, P. X. (2018a). psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release). *Nucleic Acids Research* 46, W49–W54. doi:10.1093/nar/gky316.

Dai, Z., Wang, J., Yang, X., Lu, H., Miao, X., and Shi, Z. (2018b). Modulation of plant architecture by the miR156f–OsSPL7–OsGH3.8 pathway in rice. *Journal of Experimental Botany* 69, 5117–5130. doi:10.1093/jxb/ery273.

de Jong, F., Thodey, K., Lejay, L. V., and Bevan, M. W. (2014). Glucose Elevates NITRATE TRANSPORTER2.1 Protein Levels and Nitrate Transport Activity Independently of Its HEXOKINASE1-Mediated Stimulation of NITRATE TRANSPORTER2.1. *Plant Physiol* 164, 308–320. doi:10.1104/pp.113.230599.

de Saint Germain, A., Ligerot, Y., Dun, E. A., Pillot, J.-P., Ross, J. J., Beveridge, C. A., et al. (2013). Strigolactones Stimulate Internode Elongation Independently of Gibberellins. *Plant Physiology* 163, 1012–1025. doi:10.1104/pp.113.220541.

Debernardi, J. M., Rodriguez, R. E., Mecchia, M. A., and Palatnik, J. F. (2012). Functional Specialization of the Plant miR396 Regulatory Network through Distinct MicroRNA–Target Interactions. *PLoS Genet* 8, e1002419. doi:10.1371/journal.pgen.1002419.

Demotes-Mainard, S., Huché-Thélier, L., Morel, P., Boumaza, R., Guérin, V., and Sakr, S. (2013). Temporary water restriction or light intensity limitation promotes branching in rose bush. *Scientia Horticulturae* 150, 432–440. doi:10.1016/j.scienta.2012.12.005.

Demotes-Mainard, S., Péron, T., Corot, A., Bertheloot, J., Le Gourrierec, J., Pelleschi-Travier, S., et al. (2016). Plant responses to red and far-red lights, applications in horticulture. *Environmental and Experimental Botany* 121, 4–21. doi:10.1016/j.envexpbot.2015.05.010.

Devitt, M. L., and Stafstrom, J. P. (1995). Cell cycle regulation during growth-dormancy cycles in pea axillary buds. *Plant Mol Biol* 29, 255–265. doi:10.1007/BF00043650.

Dierck, R., De Keyser, E., De Riek, J., Dhooghe, E., Van Huylenbroeck, J., Prinsen, E., et al. (2016). Change in Auxin and Cytokinin Levels Coincides with Altered Expression of Branching Genes during Axillary Bud Outgrowth in Chrysanthemum. *PLoS ONE* 11, e0161732. doi:10.1371/journal.pone.0161732.

Dijck, R., De Proft, M., and Greef, J. (1988). Role of Ethylene and Cytokinins in the Initiation of Lateral Shoot Growth in Bromeliads. *Plant physiology* 86, 836–40. doi:10.1104/pp.86.3.836.

Ding, Y., Wang, J., Lei, M., Li, Z., Jing, Y., Hu, H., et al. (2020). Small RNA sequencing revealed various microRNAs involved in ethylene-triggered flowering process in Aechmea fasciata. *Sci Rep* 10, 7348. doi:10.1038/s41598-020-63597-1.

Djennane, S., Hibrand-Saint Oyant, L., Kawamura, K., Lalanne, D., Laffaire, M., Thouroude, T., et al. (2014). Impacts of light and temperature on shoot branching gradient and expression of strigolactone synthesis and signalling genes in rose: Light and temperature effects on rose branching. *Plant Cell Environ* 37, 742–757. doi:10.1111/pce.12191.

Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., et al. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21. doi:10.1093/bioinformatics/bts635.

Dodd, A. N., Salathia, N., Hall, A., Kévei, E., Tóth, R., Nagy, F., et al. (2005). Plant Circadian Clocks Increase Photosynthesis, Growth, Survival, and Competitive Advantage. *Science* 309, 630–633. doi:10.1126/science.1115581.

Dodsworth, S. (2009). A diverse and intricate signalling network regulates stem cell fate in the shoot apical meristem. *Developmental Biology* 336, 1–9. doi:10.1016/j.ydbio.2009.09.031.

Domagalska, M. A., and Leyser, O. (2011). Signal integration in the control of shoot branching. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 211–221. doi:10.1038/nrm3088.

Dong, F., Wang, C., Dong, Y., Hao, S., Wang, L., Sun, X., et al. (2020). Differential expression of microRNAs in tomato leaves treated with different light qualities. *BMC Genomics* 21, 37. doi:10.1186/s12864-019-6440-4.

Du, Q., and Wang, H. (2015). The role of HD-ZIP III transcription factors and miR165/166 in vascular development and secondary cell wall formation. *Plant Signal Behav* 10, e1078955. doi:10.1080/15592324.2015.1078955.

Du, Y., Liu, L., Li, M., Fang, S., Shen, X., Chu, J., et al. (2017). *UNBRANCHED3* regulates branching by modulating cytokinin biosynthesis and signaling in maize and rice. *New Phytol* 214, 721–733. doi:10.1111/nph.14391.

Dubois, A., Carrere, S., Raymond, O., Pouvreau, B., Cottret, L., Roccia, A., et al. (2012). Transcriptome database resource and gene expression atlas for the rose. *BMC Genomics* 13, 638. doi:10.1186/1471-2164-13-638.

Dun, E. A., de Saint Germain, A., Rameau, C., and Beveridge, C. A. (2012). Antagonistic Action of Strigolactone and Cytokinin in Bud Outgrowth Control. *Plant Physiology* 158, 487–498. doi:10.1104/pp.111.186783.

Fahlgren, N., Howell, M. D., Kasschau, K. D., Chapman, E. J., Sullivan, C. M., Cumbie, J. S., et al. (2007). High-Throughput Sequencing of Arabidopsis microRNAs: Evidence for Frequent Birth and Death of MIRNA Genes. *PLoS ONE* 2, e219. doi:10.1371/journal.pone.0000219.

Fahlgren, N., Montgomery, T. A., Howell, M. D., Allen, E., Dvorak, S. K., Alexander, A. L., et al. (2006). Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR3 by TAS3 ta-siRNA Affects Developmental Timing and Patterning in Arabidopsis. *Current Biology* 16, 939–944. doi:10.1016/j.cub.2006.03.065.

Fang, Z., Ji, Y., Hu, J., Guo, R., Sun, S., and Wang, X. (2020). Strigolactones and Brassinosteroids Antagonistically Regulate the Stability of the D53–OsBZR1 Complex to Determine FC1 Expression in Rice Tillering. *Molecular Plant* 13, 586–597. doi:10.1016/j.molp.2019.12.005.

Ferguson, B. J., and Beveridge, C. A. (2009). Roles for Auxin, Cytokinin, and Strigolactone in Regulating Shoot Branching. *Plant Physiology* 149, 1929–1944. doi:10.1104/pp.109.135475.

Fichtner, F., Barbier, F. F., Feil, R., Watanabe, M., Annunziata, M. G., Chabikwa, T. G., et al. (2017). Trehalose 6-phosphate is involved in triggering axillary bud outgrowth in garden pea (*Pisum sativum* L.). *Plant J* 92, 611–623. doi:10.1111/tpj.13705.

Finkelstein, R. R., and Lynch, T. J. (2000). The Arabidopsis abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell* 12, 599–609. doi:10.1105/tpc.12.4.599.

Finlayson, S. A., Krishnareddy, S. R., Kebrom, T. H., and Casal, J. J. (2010). Phytochrome Regulation of Branching in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 152, 1914–1927. doi:10.1104/pp.109.148833.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. *Nature* 391, 806–811. doi:10.1038/35888.

Floris, M., Mahgoub, H., Lanet, E., Robaglia, C., and Menand, B. (2009). Post-transcriptional Regulation of Gene Expression in Plants during Abiotic Stress. *International Journal of Molecular Sciences* 10, 3168–3185. doi:10.3390/ijms10073168.

Franklin, K. A. (2008). Shade avoidance. *New Phytologist* 179, 930–944. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02507.x.

Franklin, K. A., Davis, S. J., Stoddart, W. M., Vierstra, R. D., and Whitelam, G. C. (2003). Mutant Analyses Define Multiple Roles for Phytochrome C in Arabidopsis Photomorphogenesis. *The Plant Cell* 15, 1981–1989. doi:10.1105/tpc.015164.

Fujiki, Y., Yoshikawa, Y., Sato, T., Inada, N., Ito, M., Nishida, I., et al. (2001). Dark-inducible genes from *Arabidopsis thaliana* are associated with leaf senescence and repressed by sugars. *Physiologia Plantarum* 111, 345–352. doi:10.1034/j.1399-3054.2001.1110312.x.

Furet, P.-M., Lothier, J., Demotes-Mainard, S., Travier, S., Henry, C., Guérin, V., et al. (2014). Light and nitrogen nutrition regulate apical control in Rosa hybrida L. *Journal of Plant Physiology* 171, 7–13. doi:10.1016/j.jplph.2013.10.008.

Gangappa, S. N., and Botto, J. F. (2016). The Multifaceted Roles of HY5 in Plant Growth and Development. *Mol Plant* 9, 1353–1365. doi:10.1016/j.molp.2016.07.002.

Gao, F., Wang, K., Liu, Y., Chen, Y., Chen, P., Shi, Z., et al. (2016). Blocking miR396 increases rice yield by shaping inflorescence architecture. *Nature Plants* 2, 15196. doi:10.1038/nplants.2015.196.

Gao, Z., Maurousset, L., Lemoine, R., Yoo, S.-D., van Nocker, S., and Loescher, W. (2003). Cloning, Expression, and Characterization of Sorbitol Transporters from Developing Sour Cherry Fruit and Leaf Sink Tissues. *Plant Physiol* 131, 1566–1575. doi:10.1104/pp.102.016725.

Garcia, D., Collier, S. A., Byrne, M. E., and Martienssen, R. A. (2006). Specification of Leaf Polarity in Arabidopsis via the trans-Acting siRNA Pathway. *Current Biology* 16, 933–938. doi:10.1016/j.cub.2006.03.064.

Garighan, J., Dvorak, E., Estevan, J., Loridon, K., Huettel, B., Sarah, G., et al. (2021). The Identification of Small RNAs Differentially Expressed in Apple Buds Reveals a Potential Role of the Mir159-MYB Regulatory Module during Dormancy. *Plants* 10, 2665. doi:10.3390/plants10122665.

Gim, J.-A., Ha, H.-S., Ahn, K., Kim, D.-S., and Kim, H.-S. (2014). Genome-Wide Identification and Classification of MicroRNAs Derived from Repetitive Elements. *Genomics & Informatics* 12, 261. doi:10.5808/GI.2014.12.4.261.

Giovannoni, M., Marti, L., Ferrari, S., Tanaka-Takada, N., Maeshima, M., Ott, T., et al. (2021). The plasma membrane–associated Ca2+ -binding protein, PCaP1, is required for oligogalacturonide and flagellin-induced priming and immunity. *Plant, Cell & Environment* 44, 3078–3093. doi:10.1111/pce.14118.

Girault, T. (2009). Etude du photocontrôle du débourrement du bourgeon chez le rosier (Rosa sp. L) : impact de la lumière sur le métabolisme glucidique et l'élongation cellulaire. Available at: https://www.theses.fr/2009ANGE0070.

Girault, T., Abidi, F., Sigogne, M., Pelleschi-Travier, S., Boumaza, R., Sakr, S., et al. (2010). Sugars are under light control during bud burst in Rosa sp.: Photocontrol of sugars during bud burst. *Plant, Cell & Environment*. doi:10.1111/j.1365-3040.2010.02152.x.

Girault, T., Bergougnoux, V., Combes, D., Viemont, J.-D., and Leduc, N. (2008). Light controls shoot meristem organogenic activity and leaf primordia growth during bud burst in *Rosa* sp. *Plant, Cell & Environment* 31, 1534–1544. doi:10.1111/j.1365-3040.2008.01856.x.

Gocal, G. F. W., Pharis, R. P., Yeung, E. C., and Pearce, D. (1991). Changes after Decapitation in Concentrations of Indole-3-Acetic Acid and Abscisic Acid in the Larger Axillary Bud of *Phaseolus vulgaris* L. cv Tender Green. *Plant Physiol.* 95, 344–350. doi:10.1104/pp.95.2.344.

Gocal, G. F. W., Sheldon, C. C., Gubler, F., Moritz, T., Bagnall, D. J., MacMillan, C. P., et al. (2001). GAMYB-like Genes, Flowering, and Gibberellin Signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol* 127, 1682–1693.

Gontijo, L. M., Nechols, J. R., Margolies, D. C., and Cloyd, R. A. (2012). Plant architecture and prey distribution influence foraging behavior of the predatory mite Phytoseiulus persimilis (Acari: Phytoseiidae). *Exp Appl Acarol* 56, 23–32. doi:10.1007/s10493-011-9496-7.

González-Grandío, E., Pajoro, A., Franco-Zorrilla, J. M., Tarancón, C., Immink, R. G. H., and Cubas, P. (2017). Abscisic acid signaling is controlled by a *BRANCHED1/HD-ZIP I* cascade in *Arabidopsis* axillary buds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114. doi:10.1073/pnas.1613199114.

González-Grandío, E., Poza-Carrión, C., Sorzano, C. O. S., and Cubas, P. (2013). BRANCHED1 Promotes Axillary Bud Dormancy in Response to Shade in Arabidopsis. *The Plant Cell* 25, 834–850. doi:10.1105/tpc.112.108480.

Goren, S., Huber, S. C., and Granot, D. (2011). Comparison of a novel tomato sucrose synthase, SlSUS4, with previously described SlSUS isoforms reveals distinct sequence features and differential expression patterns in association with stem maturation. *Planta* 233, 1011–1023. doi:10.1007/s00425-011-1356-5.

Greb, T., Clarenz, O., Schäfer, E., Müller, D., Herrero, R., Schmitz, G., et al. (2003). Molecular analysis of the *LATERAL SUPPRESSOR* gene in *Arabidopsis* reveals a conserved control mechanism for axillary meristem formation. *Genes Dev.* 17, 1175–1187. doi:10.1101/gad.260703.

Guilfoyle, T. J., and Hagen, G. (2007). Auxin response factors. *Curr Opin Plant Biol* 10, 453–460. doi:10.1016/j.pbi.2007.08.014.

Guo, C., Xu, Y., Shi, M., Lai, Y., Wu, X., Wang, H., et al. (2017). Repression of miR156 by miR159 Regulates the Timing of the Juvenile-to-Adult Transition in Arabidopsis. *Plant Cell* 29, 1293–1304. doi:10.1105/tpc.16.00975.

Guo, D.-L., Li, Q., Lv, W.-Q., Zhang, G.-H., and Yu, Y.-H. (2018). MicroRNA profiling analysis of developing berries for “Kyoho” and its early-ripening mutant during berry ripening. *BMC Plant Biol* 18, 285. doi:10.1186/s12870-018-1516-x.

Guo, F.-Q., Okamoto, M., and Crawford, N. M. (2003). Identification of a Plant Nitric Oxide Synthase Gene Involved in Hormonal Signaling. *Science* 302, 100–103. doi:10.1126/science.1086770.

Guo, S., Xu, Y., Liu, H., Mao, Z., Zhang, C., Ma, Y., et al. (2013). The interaction between OsMADS57 and OsTB1 modulates rice tillering via DWARF14. *Nat Commun* 4, 1566. doi:10.1038/ncomms2542.

Guo, W.-J., Nagy, R., Chen, H.-Y., Pfrunder, S., Yu, Y.-C., Santelia, D., et al. (2014). SWEET17, a Facilitative Transporter, Mediates Fructose Transport across the Tonoplast of Arabidopsis Roots and Leaves. *Plant Physiology* 164, 777–789. doi:10.1104/pp.113.232751.

Gutierrez, L., Bussell, J. D., Păcurar, D. I., Schwambach, J., Păcurar, M., and Bellini, C. (2009). Phenotypic Plasticity of Adventitious Rooting in Arabidopsis Is Controlled by Complex Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR Transcripts and MicroRNA Abundance. *Plant Cell* 21, 3119–3132. doi:10.1105/tpc.108.064758.

Hallé, F., and Oldeman, R. (1970). Essai sur l’architecture et la dynamique de croissance des arbres tropicaux. 190.

Hamama, L., Voisine, L., Pierre, S., Cesbron, D., Ogé, L., Lecerf, M., et al. (2019). Improvement of in vitro donor plant competence to increase de novo shoot organogenesis in rose genotypes. *Scientia Horticulturae* 252, 85–95. doi:10.1016/j.scienta.2019.03.040.

Han, H., Yan, A., Li, L., Zhu, Y., Feng, B., Liu, X., et al. (2020). A signal cascade originated from epidermis defines apical-basal patterning of Arabidopsis shoot apical meristems. *Nat Commun* 11, 1214. doi:10.1038/s41467-020-14989-4.

Han, J., Fang, J., Wang, C., Yin, Y., Sun, X., Leng, X., et al. (2014). Grapevine microRNAs responsive to exogenous gibberellin. *BMC Genomics* 15, 111. doi:10.1186/1471-2164-15-111.

Han, X., Lu, M., Chen, Y., Zhan, Z., Cui, Q., and Wang, Y. (2012). Selection of Reliable Reference Genes for Gene Expression Studies Using Real-Time PCR in Tung Tree during Seed Development. *PLOS ONE* 7, e43084. doi:10.1371/journal.pone.0043084.

He, Z., Zhao, X., Kong, F., Zuo, Z., and Liu, X. (2016). TCP2 positively regulates HY5/HYH and photomorphogenesis in Arabidopsis. *J Exp Bot* 67, 775–785. doi:10.1093/jxb/erv495.

Heide, O. M. (1993). Dormancy release in beech buds (Fagus sylvatica) requires both chilling and long days. *Physiologia Plantarum* 89, 187–191. doi:10.1111/j.1399-3054.1993.tb01804.x.

Hendelman, A., Stav, R., Zemach, H., and Arazi, T. (2013). The tomato NAC transcription factor SlNAM2 is involved in flower-boundary morphogenesis. *Journal of Experimental Botany* 64, 5497–5507. doi:10.1093/jxb/ert324.

Henry, C., Rabot, A., Laloi, M., Mortreau, E., Sigogne, M., Leduc, N., et al. (2011). Regulation of RhSUC2, a sucrose transporter, is correlated with the light control of bud burst in Rosa sp.: Sucrose transporter role in bud burst. *Plant, Cell & Environment* 34, 1776–1789. doi:10.1111/j.1365-3040.2011.02374.x.

Hibrand Saint-Oyant, L., Ruttink, T., Hamama, L., Kirov, I., Lakhwani, D., Zhou, N. N., et al. (2018). A high-quality genome sequence of Rosa chinensis to elucidate ornamental traits. *Nature Plants* 4, 473–484. doi:10.1038/s41477-018-0166-1.

Hobecker, K. V., Reynoso, M. A., Bustos-Sanmamed, P., Wen, J., Mysore, K. S., Crespi, M., et al. (2017). The MicroRNA390/TAS3 Pathway Mediates Symbiotic Nodulation and Lateral Root Growth. *Plant Physiology* 174, 2469–2486. doi:10.1104/pp.17.00464.

Holalu, S. V., Reddy, S. K., Blackman, B. K., and Finlayson, S. A. (2020). Phytochrome interacting factors 4 and 5 regulate axillary branching via bud abscisic acid and stem auxin signalling. *Plant Cell Environ* 43, 2224–2238. doi:10.1111/pce.13824.

Horiguchi, G., Kim, G.-T., and Tsukaya, H. (2005). The transcription factor AtGRF5 and the transcription coactivator AN3 regulate cell proliferation in leaf primordia of Arabidopsis thaliana. *Plant J* 43, 68–78. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02429.x.

Horvath, D. P., Anderson, J. V., Chao, W. S., and Foley, M. E. (2003). Knowing when to grow: signals regulating bud dormancy. *Trends in Plant Science* 8, 534–540. doi:10.1016/j.tplants.2003.09.013.

Hu, G., Hao, M., Wang, L., Liu, J., Zhang, Z., Tang, Y., et al. (2020). The Cotton miR477- *CBP60A* Module Participates in Plant Defense Against *Verticillium dahlia*. *MPMI* 33, 624–636. doi:10.1094/MPMI-10-19-0302-R.

Huang, J., Li, Z., and Zhao, D. (2016). Deregulation of the OsmiR160 Target Gene OsARF18 Causes Growth and Developmental Defects with an Alteration of Auxin Signaling in Rice. *Sci Rep* 6, 29938. doi:10.1038/srep29938.

Huang, K.-L., Tian, J., Wang, H., Fu, Y.-F., Li, Y., Zheng, Y., et al. (2021). Fatty acid export protein BnFAX6 functions in lipid synthesis and axillary bud growth in Brassica napus. *Plant Physiol* 186, 2064–2077. doi:10.1093/plphys/kiab229.

Huang, W., Peng, S., Xian, Z., Lin, D., Hu, G., Yang, L., et al. (2017). Overexpression of a tomato miR171 target gene *SlGRAS24* impacts multiple agronomical traits via regulating gibberellin and auxin homeostasis. *Plant Biotechnol J* 15, 472–488. doi:10.1111/pbi.12646.

Huché-Thélier, L., Crespel, L., Gourrierec, J. L., Morel, P., Sakr, S., and Leduc, N. (2016). Light signaling and plant responses to blue and UV radiations—Perspectives for applications in horticulture. *Environmental and Experimental Botany* 121, 22–38. doi:10.1016/j.envexpbot.2015.06.009.

Ito, T., Okada, K., Fukazawa, J., and Takahashi, Y. (2018). DELLA-dependent and -independent gibberellin signaling. *Plant Signal Behav* 13, e1445933. doi:10.1080/15592324.2018.1445933.

James, A. B., Syed, N. H., Bordage, S., Marshall, J., Nimmo, G. A., Jenkins, G. I., et al. (2012). Alternative splicing mediates responses of the Arabidopsis circadian clock to temperature changes. *Plant Cell* 24, 961–981. doi:10.1105/tpc.111.093948.

Jatan, R., Chauhan, P. S., and Lata, C. (2020). High-Throughput Sequencing and Expression Analysis Suggest the Involvement of Pseudomonas putida RA-Responsive microRNAs in Growth and Development of Arabidopsis. *Int J Mol Sci* 21, 5468. doi:10.3390/ijms21155468.

Jiao, Y., Wang, Y., Xue, D., Wang, J., Yan, M., Liu, G., et al. (2010). Regulation of OsSPL14 by OsmiR156 defines ideal plant architecture in rice. *Nat Genet* 42, 541–544. doi:10.1038/ng.591.

Jin, Z., Shen, J., Qiao, Z., Yang, G., Wang, R., and Pei, Y. (2011). Hydrogen sulfide improves drought resistance in Arabidopsis thaliana. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 414, 481–486. doi:10.1016/j.bbrc.2011.09.090.

Kalousek, P., Buchtová, D., Balla, J., Reinöhl, V., and Procházka, S. (2014). Cytokinins and polar transport of auxin in axillary pea buds. *Acta Univ. Agric. Silvic. Mendelianae Brun.* 58, 79–88. doi:10.11118/actaun201058040079.

Kebrom, T. H., Chandler, P. M., Swain, S. M., King, R. W., Richards, R. A., and Spielmeyer, W. (2012). Inhibition of Tiller Bud Outgrowth in the *tin* Mutant of Wheat Is Associated with Precocious Internode Development. *Plant Physiology* 160, 308–318. doi:10.1104/pp.112.197954.

Kebrom, T. H., and Mullet, J. E. (2016). Transcriptome Profiling of Tiller Buds Provides New Insights into PhyB Regulation of Tillering and Indeterminate Growth in Sorghum. *Plant Physiol.* 170, 2232–2250. doi:10.1104/pp.16.00014.

Keller, T., Abbott, J., Moritz, T., and Doerner, P. (2006). *Arabidopsis REGULATOR OF AXILLARY MERISTEMS1* Controls a Leaf Axil Stem Cell Niche and Modulates Vegetative Development. *The Plant Cell* 18, 598–611. doi:10.1105/tpc.105.038588.

Kidner, C. A., and Martienssen, R. A. (2005). The developmental role of microRNA in plants. *Curr Opin Plant Biol* 8, 38–44. doi:10.1016/j.pbi.2004.11.008.

Kim, J. H., Choi, D., and Kende, H. (2003). The AtGRF family of putative transcription factors is involved in leaf and cotyledon growth in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 36, 94–104. doi:10.1046/j.1365-313X.2003.01862.x.

Klepek, Y.-S., Geiger, D., Stadler, R., Klebl, F., Landouar-Arsivaud, L., Lemoine, R., et al. (2005). Arabidopsis POLYOL TRANSPORTER5, a New Member of the Monosaccharide Transporter-Like Superfamily, Mediates H+-Symport of Numerous Substrates, Including myo-Inositol, Glycerol, and Ribose. *Plant Cell* 17, 204–218. doi:10.1105/tpc.104.026641.

Klepek, Y.-S., Volke, M., Konrad, K. R., Wippel, K., Hoth, S., Hedrich, R., et al. (2010). Arabidopsis thaliana POLYOL/MONOSACCHARIDE TRANSPORTERS 1 and 2: fructose and xylitol/H+ symporters in pollen and young xylem cells. *J Exp Bot* 61, 537–550. doi:10.1093/jxb/erp322.

Knox, J. P., and Wareing, P. F. (1984). Apical Dominance in Phaseolus vulgaris L.: The Possible Roles of Abscisic and Indole-3-Acetic Acid. 6.

Koornneef, M. (1980). Induction and Analysis of Gibberellin Sensitive Mutants in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. *Theor. Appl. Genet.*, 7.

Kornblihtt, A. R., Schor, I. E., Alló, M., Dujardin, G., Petrillo, E., and Muñoz, M. J. (2013). Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 153–165. doi:10.1038/nrm3525.

Koyama, T., Mitsuda, N., Seki, M., Shinozaki, K., and Ohme-Takagi, M. (2010). TCP Transcription Factors Regulate the Activities of ASYMMETRIC LEAVES1 and miR164, as Well as the Auxin Response, during Differentiation of Leaves in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 22, 3574–3588. doi:10.1105/tpc.110.075598.

Koyama, T., Sato, F., and Ohme-Takagi, M. (2017). Roles of miR319 and TCP Transcription Factors in Leaf Development. *Plant Physiology* 175, 874–885. doi:10.1104/pp.17.00732.

Kozomara, A., Birgaoanu, M., and Griffiths-Jones, S. (2019). miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research* 47, D155–D162. doi:10.1093/nar/gky1141.

Kozomara, A., and Griffiths-Jones, S. (2014). miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 42, D68-73. doi:10.1093/nar/gkt1181.

Kravchik, M., Stav, R., Belausov, E., and Arazi, T. (2019). Functional Characterization of microRNA171 Family in Tomato. *Plants* 8, 10. doi:10.3390/plants8010010.

Kurakawa, T., Ueda, N., Maekawa, M., Kobayashi, K., Kojima, M., Nagato, Y., et al. (2007). Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* 445, 652–655. doi:10.1038/nature05504.

Lakhotia, N., Joshi, G., Bhardwaj, A. R., Katiyar-Agarwal, S., Agarwal, M., Jagannath, A., et al. (2014). Identification and characterization of miRNAome in root, stem, leaf and tuber developmental stages of potato (Solanum tuberosum L.) by high-throughput sequencing. *BMC Plant Biol* 14, 6. doi:10.1186/1471-2229-14-6.

Lang, G. A., Early, J. D., Martin, G. C., and Darnell, R. L. (1987). Endo-, para-, and ecodormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. *HortScience (USA)*.

Latijnhouwers, M., Xu, X.-M., and Møller, S. G. (2010). Arabidopsis stromal 70-kDa heat shock proteins are essential for chloroplast development. *Planta* 232, 567–578. doi:10.1007/s00425-010-1192-z.

Laufs, P., Peaucelle, A., Morin, H., and Traas, J. (2004). MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in Arabidopsis meristems. *Development* 131, 4311–4322. doi:10.1242/dev.01320.

Lauressergues, D., Couzigou, J.-M., Clemente, H. S., Martinez, Y., Dunand, C., Bécard, G., et al. (2015). Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides. *Nature* 520, 90–93. doi:10.1038/nature14346.

Le Bris, M., Michaux-Ferrière, N., Jacob, Y., Poupet, A., Barthe, P., Guigonis, J.-M., et al. (1999). Regulation of bud dormancy by manipulation of ABA in isolated buds of Rosa hybrida cultured in vitro. *Functional Plant Biol.* 26, 273. doi:10.1071/PP98133.

Le Hir, R., Leduc, N., Jeannette, E., Viemont, J.-D., and Pelleschi-Travier, S. (2006). Variations in sucrose and ABA concentrations are concomitant with heteroblastic leaf shape changes in a rhythmically growing species (Quercus robur). *Tree Physiology* 26, 229–238. doi:10.1093/treephys/26.2.229.

Le Moigne, M.-A. (2018). Etude de l'implication de l'azote dans le débourrement des bourgeons et l'allongement des axes qui en sont issus chez Rosa hybrida. Available at: http://www.theses.fr/2018ANGE0012.

Le Moigne, M.-A., Guérin, V., Furet, P.-M., Billard, V., Lebrec, A., Spíchal, L., et al. (2018). Asparagine and sugars are both required to sustain secondary axis elongation after bud outgrowth in Rosa hybrida. *Journal of Plant Physiology* 222, 17–27. doi:10.1016/j.jplph.2017.12.013.

Leduc, N., Roman, H., Barbier, F., Péron, T., Huché-Thélier, L., Lothier, J., et al. (2014). Light Signaling in Bud Outgrowth and Branching in Plants. *Plants* 3, 223–250. doi:10.3390/plants3020223.

Leida, C., Terol, J., Martí, G., Agustí, M., Llácer, G., Badenes, M. L., et al. (2010). Identification of genes associated with bud dormancy release in Prunus persica by suppression subtractive hybridization. *Tree Physiology* 30, 655–666. doi:10.1093/treephys/tpq008.

Li, C., and Zhang, B. (2016). MicroRNAs in Control of Plant Development: MicroRNAs AND PLANT DEVELOPMENT. *J. Cell. Physiol* 231, 303–313. doi:10.1002/jcp.25125.

Li, G., Tan, M., Cheng, F., Liu, X., Qi, S., Chen, H., et al. (2018). Molecular role of cytokinin in bud activation and outgrowth in apple branching based on transcriptomic analysis. *Plant Mol Biol* 98, 261–274. doi:10.1007/s11103-018-0781-2.

Li, J., Yang, Z., Yu, B., Liu, J., and Chen, X. (2005). Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis. *Curr Biol* 15, 1501–1507. doi:10.1016/j.cub.2005.07.029.

Li, X., Xia, K., Liang, Z., Chen, K., Gao, C., and Zhang, M. (2016). MicroRNA393 is involved in nitrogen-promoted rice tillering through regulation of auxin signal transduction in axillary buds. *Sci Rep* 6, 32158. doi:10.1038/srep32158.

Lian, H., Wang, L., Ma, N., Zhou, C.-M., Han, L., Zhang, T.-Q., et al. (2021). Redundant and specific roles of individual MIR172 genes in plant development. *PLoS Biol* 19, e3001044. doi:10.1371/journal.pbio.3001044.

Liao, Y., Smyth, G. K., and Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30, 923–930. doi:10.1093/bioinformatics/btt656.

Li-Marchetti, C., Le Bras, C., Relion, D., Citerne, S., HuchÃ©-ThÃ©lier, L., Sakr, S., et al. (2015). Genotypic differences in architectural and physiological responses to water restriction in rose bush. *Front. Plant Sci.* 06. doi:10.3389/fpls.2015.00355.

Lin, C., and Todo, T. (2005). The cryptochromes. *Genome Biol* 6, 220. doi:10.1186/gb-2005-6-5-220.

Lin, Q., Yang, J., Wang, Q., Zhu, H., Chen, Z., Dao, Y., et al. (2019). Overexpression of the trehalose-6-phosphate phosphatase family gene AtTPPF improves the drought tolerance of Arabidopsis thaliana. *BMC Plant Biol* 19, 381. doi:10.1186/s12870-019-1986-5.

Lin, R., and Wang, H. (2004). Arabidopsis FHY3/FAR1 gene family and distinct roles of its members in light control of Arabidopsis development. *Plant Physiol* 136, 4010–4022. doi:10.1104/pp.104.052191.

Liu, D., Song, Y., Chen, Z., and Yu, D. (2009). Ectopic expression of miR396 suppresses *GRF* target gene expression and alters leaf growth in *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum* 136, 223–236. doi:10.1111/j.1399-3054.2009.01229.x.

Liu, H., Yu, H., Tang, G., and Huang, T. (2018). Small but powerful: function of microRNAs in plant development. *Plant Cell Rep* 37, 515–528. doi:10.1007/s00299-017-2246-5.

Liu, P.-P., Montgomery, T. A., Fahlgren, N., Kasschau, K. D., Nonogaki, H., and Carrington, J. C. (2007). Repression of AUXIN RESPONSE FACTOR10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages: microRNA in Arabidopsis seed germination. *The Plant Journal* 52, 133–146. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03218.x.

Liu, S., Mi, X., Zhang, R., An, Y., Zhou, Q., Yang, T., et al. (2019a). Integrated analysis of miRNAs and their targets reveals that miR319c/TCP2 regulates apical bud burst in tea plant (Camellia sinensis). *Planta* 250, 1111–1129. doi:10.1007/s00425-019-03207-1.

Liu, T., Tang, J., Chen, L., Zeng, J., Wen, J., Yi, B., et al. (2019b). Differential expression of miRNAs and their targets in wax-deficient rapeseed. *Sci Rep* 9, 12201. doi:10.1038/s41598-019-48439-z.

Liu, Y., and El-Kassaby, Y. (2017). Regulatory crosstalk between microRNAs and hormone signalling cascades controls the variation on seed dormancy phenotype at Arabidopsis thaliana seed set. *Plant Cell Reports* 36. doi:10.1007/s00299-017-2111-6.

Lo, S.-F., Yang, S.-Y., Chen, K.-T., Hsing, Y.-I., Zeevaart, J. A. D., Chen, L.-J., et al. (2008). A Novel Class of Gibberellin 2-Oxidases Control Semidwarfism, Tillering, and Root Development in Rice. *The Plant Cell* 20, 2603–2618. doi:10.1105/tpc.108.060913.

Love, M. I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15, 550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8.

Lu, C., and Fedoroff, N. (2000). A Mutation in the Arabidopsis HYL1 Gene Encoding a dsRNA Binding Protein Affects Responses to Abscisic Acid, Auxin, and Cytokinin. *Plant Cell* 12, 2351–2365.

Lu, Z., Yu, H., Xiong, G., Wang, J., Jiao, Y., Liu, G., et al. (2013). Genome-Wide Binding Analysis of the Transcription Activator IDEAL PLANT ARCHITECTURE1 Reveals a Complex Network Regulating Rice Plant Architecture. *Plant Cell* 25, 3743–3759. doi:10.1105/tpc.113.113639.

Luo, M., Gao, Z., Li, H., Li, Q., Zhang, C., Xu, W., et al. (2018). Selection of reference genes for miRNA qRT-PCR under abiotic stress in grapevine. *Sci Rep* 8, 4444. doi:10.1038/s41598-018-22743-6.

Mallory, A. C., Bartel, D. P., and Bartel, B. (2005). MicroRNA-Directed Regulation of Arabidopsis *AUXIN RESPONSE FACTOR17* Is Essential for Proper Development and Modulates Expression of Early Auxin Response Genes. *The Plant Cell* 17, 1360–1375. doi:10.1105/tpc.105.031716.

Marin, E., Jouannet, V., Herz, A., Lokerse, A. S., Weijers, D., Vaucheret, H., et al. (2010). miR390, *Arabidopsis TAS3* tasiRNAs, and Their *AUXIN RESPONSE FACTOR* Targets Define an Autoregulatory Network Quantitatively Regulating Lateral Root Growth. *The Plant Cell* 22, 1104–1117. doi:10.1105/tpc.109.072553.

Marquat, C., Vandamme, M., Gendraud, M., and Pétel, G. (1999). Dormancy in vegetative buds of peach: relation between carbohydrate absorption potentials and carbohydrate concentration in the bud during dormancy and its release. *Scientia Horticulturae* 79, 151–162. doi:10.1016/S0304-4238(98)00203-9.

Maruta, T., Yonemitsu, M., Yabuta, Y., Tamoi, M., Ishikawa, T., and Shigeoka, S. (2008). Arabidopsis phosphomannose isomerase 1, but not phosphomannose isomerase 2, is essential for ascorbic acid biosynthesis. *J Biol Chem* 283, 28842–28851. doi:10.1074/jbc.M805538200.

Marzec, M., and Muszynska, A. (2015). In Silico Analysis of the Genes Encoding Proteins that Are Involved in the Biosynthesis of the RMS/MAX/D Pathway Revealed New Roles of Strigolactones in Plants. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 6757–6782. doi:10.3390/ijms16046757.

Mason, M. G., Ross, J. J., Babst, B. A., Wienclaw, B. N., and Beveridge, C. A. (2014). Sugar demand, not auxin, is the initial regulator of apical dominance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 6092–6097. doi:10.1073/pnas.1322045111.

Matsui, T., Omasa, K., and Horie, T. (2000). High Temperature at Flowering Inhibits Swelling of Pollen Grains, a Driving Force for Thecae Dehiscence in Rice (Oryza sativa L.). *Plant Production Science* 3, 430–434. doi:10.1626/pps.3.430.

Maugarny-Calès, A., and Laufs, P. (2018). Getting leaves into shape: a molecular, cellular, environmental and evolutionary view. *Development* 145, dev161646. doi:10.1242/dev.161646.

Mauget, J. C., Rageau, R., and International Society for Horticultural Science, . (1987). Bud dormancy and adaptation of apple tree to mild winter climates. in *Symposium* (Florianopolis, Brazil). Available at: https://hal.inrae.fr/hal-02854115 [Accessed April 7, 2022].

Maurel, K., Leite, G. B., Bonhomme, M., Guilliot, A., Rageau, R., Petel, G., et al. (2004). Trophic control of bud break in peach (Prunus persica) trees: a possible role of hexoses. *Tree Physiology* 24, 579–588. doi:10.1093/treephys/24.5.579.

McConnell, J. R., Emery, J., Eshed, Y., Bao, N., Bowman, J., and Barton, M. K. (2001). Role of PHABULOSA and PHAVOLUTA in determining radial patterning in shoots. *Nature* 411, 709–713. doi:10.1038/35079635.

Meitha, K., Agudelo-Romero, P., Signorelli, S., Gibbs, D. J., Considine, J. A., Foyer, C. H., et al. (2018). Developmental control of hypoxia during bud burst in grapevine. *Plant, Cell & Environment* 41, 1154–1170. doi:10.1111/pce.13141.

Millar, A. A., Lohe, A., and Wong, G. (2019). Biology and Function of miR159 in Plants. *Plants* 8, 255. doi:10.3390/plants8080255.

Min, Z., Zhao, X., Li, R., Yang, B., Liu, M., and Fang, Y. (2017). Comparative transcriptome analysis provides insight into differentially expressed genes related to bud dormancy in grapevine (Vitis vinifera). *Scientia Horticulturae* 225, 213–220. doi:10.1016/j.scienta.2017.06.033.

Mitsuhashi, W., Sasaki, S., Kanazawa, A., Yang, Y.-Y., Kamiya, Y., and Toyomasu, T. (2004). Differential Expression of Acid Invertase Genes during Seed Germination in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 68, 602–608. doi:10.1271/bbb.68.602.

Miura, K., Ikeda, M., Matsubara, A., Song, X.-J., Ito, M., Asano, K., et al. (2010). OsSPL14 promotes panicle branching and higher grain productivity in rice. *Nat Genet* 42, 545–549. doi:10.1038/ng.592.

Moldovan, G.-L., Pfander, B., and Jentsch, S. (2007). PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* 129, 665–679. doi:10.1016/j.cell.2007.05.003.

Montgomery, T. A., Howell, M. D., Cuperus, J. T., Li, D., Hansen, J. E., Alexander, A. L., et al. (2008). Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell* 133, 128–141. doi:10.1016/j.cell.2008.02.033.

Montigny, A., Tavormina, P., Duboe, C., San Clémente, H., Aguilar, M., Valenti, P., et al. (2021). *Drosophila* primary microRNA-8 encodes a microRNA encoded peptide acting in parallel of *miR-8*. Developmental Biology doi:10.1101/2021.03.22.434418.

Morea, E. G. O., da Silva, E. M., e Silva, G. F. F., Valente, G. T., Barrera Rojas, C. H., Vincentz, M., et al. (2016). Functional and evolutionary analyses of the miR156 and miR529 families in land plants. *BMC Plant Biol* 16, 40. doi:10.1186/s12870-016-0716-5.

Moriya, Y., Itoh, M., Okuda, S., Yoshizawa, A. C., and Kanehisa, M. (2007). KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic Acids Res* 35, W182-185. doi:10.1093/nar/gkm321.

Motose, H., Takatani, S., Ikeda, T., and Takahashi, T. (2012). NIMA-related kinases regulate directional cell growth and organ development through microtubule function in Arabidopsis thaliana. *Plant Signal Behav* 7, 1552–1555. doi:10.4161/psb.22412.

Motose, H., Tominaga, R., Wada, T., Sugiyama, M., and Watanabe, Y. (2008). A NIMA-related protein kinase suppresses ectopic outgrowth of epidermal cells through its kinase activity and the association with microtubules. *Plant J* 54, 829–844. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03445.x.

Müller, D., and Leyser, O. (2011). Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. *Annals of Botany* 107, 1203–1212. doi:10.1093/aob/mcr069.

Nagatani, A., and Reed, J. (1993). Isolation and Initial Characterization of Arabidopsis Mutants That Are Deficient in Phytochrome A'. 102, 9.

Napoli, C. (1996). Highly Branched Phenotype of the Petunia dad1-1 Mutant Is Reversed by Grafting. *Plant Physiology* 111, 27–37. doi:10.1104/pp.111.1.27.

Naqvi, A. R., Sarwat, M., Hasan, S., and Roychodhury, N. (2012). Biogenesis, functions and fate of plant microRNAs. *J Cell Physiol* 227, 3163–3168. doi:10.1002/jcp.24052.

Nawrocki, E. P., Burge, S. W., Bateman, A., Daub, J., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., et al. (2015). Rfam 12.0: updates to the RNA families database. *Nucleic Acids Research* 43, D130–D137. doi:10.1093/nar/gku1063.

Ni, J., Zhao, M.-L., Chen, M.-S., Pan, B.-Z., Tao, Y.-B., and Xu, Z.-F. (2017). Comparative transcriptome analysis of axillary buds in response to the shoot branching regulators gibberellin A3 and 6-benzyladenine in Jatropha curcas. *Sci Rep* 7, 11417. doi:10.1038/s41598-017-11588-0.

Nicolas, A., Maugarny-Calès, A., Adroher, B., Chelysheva, L., Li, Y., Burguet, J., et al. (2022). De novo stem cell establishment in meristems requires repression of organ boundary cell fate. 2022.02.03.478990. doi:10.1101/2022.02.03.478990.

Nilsen, T. W., and Graveley, B. R. (2010). Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* 463, 457–463. doi:10.1038/nature08909.

Noriega, X., and Pérez, F. J. (2017). ABA Biosynthesis Genes are Down-regulated While Auxin and Cytokinin Biosynthesis Genes are Up-regulated During the Release of Grapevine Buds From Endodormancy. *J Plant Growth Regul* 36, 814–823. doi:10.1007/s00344-017-9685-7.

Oh, E., Zhu, J.-Y., Bai, M.-Y., Arenhart, R. A., Sun, Y., and Wang, Z.-Y. (2014). Cell elongation is regulated through a central circuit of interacting transcription factors in the Arabidopsis hypocotyl. *eLife* 3, e03031. doi:10.7554/eLife.03031.

OLDEMAN, R. A. A. (1974). L'architecture de la foret guyanaise. *Mem. O. R. S. T. O. M.* 13, 1–204.

Ó'Maoiléidigh, D. S., Driel, A. D. van, Singh, A., Sang, Q., Bec, N. L., Vincent, C., et al. (2021). Systematic analyses of the MIR172 family members of Arabidopsis define their distinct roles in regulation of APETALA2 during floral transition. *PLOS Biology* 19, e3001043. doi:10.1371/journal.pbio.3001043.

Omidbakhshfard, M. A., Proost, S., Fujikura, U., and Mueller-Roeber, B. (2015). Growth-Regulating Factors (GRFs): A Small Transcription Factor Family with Important Functions in Plant Biology. *Molecular Plant* 8, 998–1010. doi:10.1016/j.molp.2015.01.013.

Ophir, R., Pang, X., Halaly, T., Venkateswari, J., Lavee, S., Galbraith, D., et al. (2009). Gene-expression profiling of grape bud response to two alternative dormancy-release stimuli expose possible links between impaired mitochondrial activity, hypoxia, ethylene-ABA interplay and cell enlargement. *Plant Mol Biol* 71, 403–423. doi:10.1007/s11103-009-9531-9.

Or, E., Vilozny, I., Fennell, A., Eyal, Y., and Ogrodovitch, A. (2002). Dormancy in grape buds: isolation and characterization of catalase cDNA and analysis of its expression following chemical induction of bud dormancy release. *Plant Science* 162, 121–130. doi:10.1016/S0168-9452(01)00542-8.

Ortiz-Morea, F. A., Vicentini, R., Silva, G. F. F., Silva, E. M., Carrer, H., Rodrigues, A. P., et al. (2013). Global analysis of the sugarcane microtranscriptome reveals a unique composition of small RNAs associated with axillary bud outgrowth. *Journal of Experimental Botany* 64, 2307–2320. doi:10.1093/jxb/ert089.

Pagano, L., Rossi, R., Paesano, L., Marmiroli, N., and Marmiroli, M. (2021). miRNA regulation and stress adaptation in plants. *Environmental and Experimental Botany* 184, 104369. doi:10.1016/j.envexpbot.2020.104369.

Palatnik, J. F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J. C., et al. (2003). Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* 425, 257–263. doi:10.1038/nature01958.

Park, J., Cui, Y., and Kang, B.-H. (2015). AtPGL3 is an Arabidopsis BURP domain protein that is localized to the cell wall and promotes cell enlargement. *Frontiers in Plant Science* 6. Available at: https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2015.00412.

Pashkovskiy, P. P., Kartashov, A. V., Zlobin, I. E., Pogosyan, S. I., and Kuznetsov, V. V. (2016). Blue light alters miR167 expression and microRNA-targeted auxin response factor genes in Arabidopsis thaliana plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 104, 146–154. doi:10.1016/j.plaphy.2016.03.018.

Pashkovskiy, P., Ryazansky, S., Kartashov, A., Voloshin, R., Khudyakova, A., Kosobryukhov, A. A., et al. (2021). Effect of red light on photosynthetic acclimation and the gene expression of certain light signalling components involved in the microRNA biogenesis in the extremophile Eutrema salsugineum. *Journal of Biotechnology* 325, 35–42. doi:10.1016/j.jbiotec.2020.11.018.

Pellny, T. K., Ghannoum, O., Conroy, J. P., Schluepmann, H., Smeekens, S., Andralojc, J., et al. (2004). Genetic modification of photosynthesis with E. coli genes for trehalose synthesis. *Plant Biotechnology Journal* 2, 71–82. doi:10.1111/j.1467-7652.2004.00053.x.

Peng, J., Richards, D. E., Hartley, N. M., Murphy, G. P., Devos, K. M., Flintham, J. E., et al. (1999). 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* 400, 256–261. doi:10.1038/22307.

Peng, T., Qiao, M., Liu, H., Teotia, S., Zhang, Z., Zhao, Y., et al. (2018). A Resource for Inactivation of MicroRNAs Using Short Tandem Target Mimic Technology in Model and Crop Plants. *Mol Plant* 11, 1400–1417. doi:10.1016/j.molp.2018.09.003.

Pérez, V. I., Van Remmen, H., Bokov, A., Epstein, C. J., Vijg, J., and Richardson, A. (2009). The overexpression of major antioxidant enzymes does not extend the lifespan of mice. *Aging Cell* 8, 73–75. doi:10.1111/j.1474-9726.2008.00449.x.

Perez-Santangelo, S., Schlaen, R., and Yanovsky, M. (2012). Genomic analysis reveals novel connections between alternative splicing and circadian regulatory networks. *Briefings in functional genomics* 12. doi:10.1093/bfgp/els052.

Phelps-Durr, T. L., Thomas, J., Vahab, P., and Timmermans, M. C. P. (2005). Maize rough sheath2 and Its Arabidopsis Orthologue ASYMMETRIC LEAVES1 Interact with HIRA, a Predicted Histone Chaperone, to Maintain knox Gene Silencing and Determinacy during Organogenesis. *The Plant Cell* 17, 2886–2898. doi:10.1105/tpc.105.035477.

Porcher, A., Guérin, V., Montrichard, F., Lebrec, A., Lothier, J., and Vian, A. (2020). Ascorbate glutathione-dependent H2O2 scavenging is an important process in axillary bud outgrowth in rosebush. *Annals of Botany* 126, 1049–1062. doi:10.1093/aob/mcaa130.

Porcher, A., Guérin, V., Leduc, N., Lebrec, A., Lothier, J., and Vian, A. (2021). Ascorbate–glutathione pathways mediated by cytokinin regulate H2O2 levels in light-controlled rose bud burst. *Plant Physiology* 186, 910–928. doi:10.1093/plphys/kiab123.

Prasad, T. K., Li, X., Abdel-Rahman, A. M., Hosokawa, Z., Cloud, N. P., Lamotte, C. E., et al. (1993). Does Auxin Play a Role in the Release of Apical Dominance by Shoot Inversion in Ipomoea nil *Annals of Botany* 71, 223–229. doi:10.1006/anbo.1993.1028.

Prel, A., Dozier, C., Combier, J.-P., Plaza, S., and Besson, A. (2021). Evidence That Regulation of Pri-miRNA/miRNA Expression Is Not a General Rule of miPEPs Function in Humans. *IJMS* 22, 3432. doi:10.3390/ijms22073432.

Preston, J. C., and Hileman, L. C. (2013). Functional Evolution in the Plant SQUAMOSA-PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) Gene Family. *Front. Plant Sci.* 4. doi:10.3389/fpls.2013.00080.

Pruneda-Paz, J. L., and Kay, S. A. (2010). An expanding universe of circadian networks in higher plants. *Trends Plant Sci* 15, 259–265. doi:10.1016/j.tplants.2010.03.003.

Prusinkiewicz, P., Crawford, S., Smith, R. S., Ljung, K., Bennett, T., Ongaro, V., et al. (2009). Control of bud activation by an auxin transport switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 17431–17436. doi:10.1073/pnas.0906696106.

Pulido, A., and Laufs, P. (2010). Co-ordination of developmental processes by small RNAs during leaf development. *Journal of Experimental Botany* 61, 1277–1291. doi:10.1093/jxb/erp397.

Qiao, Y., Zhang, J., Zhang, J., Wang, Z., Ran, A., Guo, H., et al. (2017). Integrated RNA-seq and sRNA-seq analysis reveals miRNA effects on secondary metabolism in Solanum tuberosum L. *Mol Genet Genomics* 292, 37–52. doi:10.1007/s00438-016-1253-5.

Qin, L.-X., Rao, Y., Li, L., Huang, J.-F., Xu, W.-L., and Li, X.-B. (2013). Cotton GalT1 Encoding a Putative Glycosyltransferase Is Involved in Regulation of Cell Wall Pectin Biosynthesis during Plant Development. *PLOS ONE* 8, e59115. doi:10.1371/journal.pone.0059115.

Qiu, Q.-S., Hardin, S. C., Mace, J., Brutnell, T. P., and Huber, S. C. (2007). Light and Metabolic Signals Control the Selective Degradation of Sucrose Synthase in Maize Leaves during Deetiolation. *Plant Physiol* 144, 468–478. doi:10.1104/pp.106.095182.

Rabot, A., Henry, C., Ben Baaziz, K., Mortreau, E., Azri, W., Lothier, J., et al. (2012). Insight into the Role of Sugars in Bud Burst Under Light in the Rose. *Plant and Cell Physiology* 53, 1068–1082. doi:10.1093/pcp/pcs051.

Rabot, A., Portemer, V., Péron, T., Mortreau, E., Leduc, N., Hamama, L., et al. (2014). Interplay of Sugar, Light and Gibberellins in Expression of Rosa hybrida Vacuolar Invertase 1 Regulation. *Plant and Cell Physiology* 55, 1734–1748. doi:10.1093/pcp/pcu106.

Rajagopalan, R., Vaucheret, H., Trejo, J., and Bartel, D. P. (2006). A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in Arabidopsis thaliana. *Genes Dev.* 20, 3407–3425. doi:10.1101/gad.1476406.

Raman, S., Greb, T., Peaucelle, A., Blein, T., Laufs, P., and Theres, K. (2008). Interplay of miR164, *CUP-SHAPED COTYLEDON* genes and *LATERAL SUPPRESSOR* controls axillary meristem formation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 55, 65–76. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03483.x.

Rameau, C., Bertheloot, J., Leduc, N., Andrieu, B., Foucher, F., and Sakr, S. (2015). Multiple pathways regulate shoot branching. *Front. Plant Sci.* 5. doi:10.3389/fpls.2014.00741.

Rank, A. P., and Koch, A. (2021). Lab-to-Field Transition of RNA Spray Applications – How Far Are We? *Frontiers in Plant Science* 12. Available at: https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2021.755203.

Ray, A., Lang, J. D., Golden, T., and Ray, S. (1996). SHORT INTEGUMENT (SIN1), a gene required for ovule development in Arabidopsis, also controls flowering time. *Development* 122, 2631–2638. doi:10.1242/dev.122.9.2631.

Raymond, O., Gouzy, J., Just, J., Badouin, H., Verdenaud, M., Lemainque, A., et al. (2018). The Rosa genome provides new insights into the domestication of modern roses. *Nat Genet* 50, 772–777. doi:10.1038/s41588-018-0110-3.

Reed, J. W., Nagatani, A., Elich, T. D., Fagan, M., and Chory, J. (1994). Phytochrome a and Phytochrome B Have Overlapping but Distinct Functions in Arabidopsis Development. *Plant Physiology* 104, 1139–1149.

Reinhardt, D., and Kuhlemeier, C. (2002). Plant architecture. *EMBO Rep* 3, 846–851. doi:10.1093/embo-reports/kvf177.

Reyes, J. L., and Chua, N.-H. (2007). ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination: miR159 regulation of ABA responses during germination. *The Plant Journal* 49, 592–606. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02980.x.

Rhoades, M. W., Reinhart, B. J., Lim, L. P., Burge, C. B., Bartel, B., and Bartel, D. P. (2002). Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110, 513–520. doi:10.1016/s0092-8674(02)00863-2.

Rodriguez, R. E., Mecchia, M. A., Debernardi, J. M., Schommer, C., Weigel, D., and Palatnik, J. F. (2010). Control of cell proliferation in *Arabidopsis thaliana* by microRNA miR396. *Development* 137, 103–112. doi:10.1242/dev.043067.

Roman, H., Girault, T., Barbier, F., Péron, T., Brouard, N., Pěnčík, A., et al. (2016). Cytokinins Are Initial Targets of Light in the Control of Bud Outgrowth. *Plant Physiol.* 172, 489–509. doi:10.1104/pp.16.00530.

Roman, H., Girault, T., Le Gourrierec, J., and Leduc, N. (2017). *In silico* analysis of 3 expansin gene promoters reveals 2 hubs controlling light and cytokinins response during bud outgrowth. *Plant Signaling & Behavior* 12, e1284725. doi:10.1080/15592324.2017.1284725.

Romanowski, A., Furniss, J. J., Hussain, E., and Halliday, K. J. (2021). Phytochrome regulates cellular response plasticity and the basic molecular machinery of leaf development. *Plant Physiology* 186, 1220–1239. doi:10.1093/plphys/kiab112.

Rowley, M. J., Avrutsky, M. I., Sifuentes, C. J., Pereira, L., and Wierzbicki, A. T. (2011). Independent Chromatin Binding of ARGONAUTE4 and SPT5L/KTF1 Mediates Transcriptional Gene Silencing. *PLOS Genetics* 7, e1002120. doi:10.1371/journal.pgen.1002120.

Ryan, C. A. (2000). The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim Biophys Acta* 1477, 112–121. doi:10.1016/s0167-4838(99)00269-1.

Sabatier, S., and Barthélémy, D. (1999). Growth Dynamics and Morphology of Annual Shoots, According to their Architectural Position, in Young Cedrus atlantica (Endl.) Manetti ex Carrière (Pinaceae). *Annals of Botany* 84, 387–392. doi:10.1006/anbo.1999.0939.

Sachs, T. (1975). The induction of transport channels by auxin. *Planta* 127, 201–206. doi:10.1007/BF00380716.

Sachs, T., and Thimann, K. V. (1964). Release of Lateral Buds from Apical Dominance. *Nature* 201, 939–940. doi:10.1038/201939a0.

Sagi, M., Davydov, O., Orazova, S., Yesbergenova, Z., Ophir, R., Stratmann, J. W., et al. (2004). Plant Respiratory Burst Oxidase Homologs Impinge on Wound Responsiveness and Development in *Lycopersicon esculentum* [W]. *The Plant Cell* 16, 616–628. doi:10.1105/tpc.019398.

Sagi, M., and Fluhr, R. (2001). Superoxide production by plant homologues of the gp91(phox) NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol* 126, 1281–1290. doi:10.1104/pp.126.3.1281.

Sánchez-Simarro, J., Bernat-Silvestre, C., Gimeno-Ferrer, F., Selvi-Martínez, P., Montero-Pau, J., Aniento, F., et al. (2020). Loss of Arabidopsis β-COP Function Affects Golgi Structure, Plant Growth and Tolerance to Salt Stress. *Frontiers in Plant Science* 11. Available at: https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2020.00430 [Accessed April 10, 2022].

Sánchez-Vicente, I., Lechón, T., Fernández-Marcos, M., Sanz, L., and Lorenzo, O. (2021). Nitric Oxide Alters the Pattern of Auxin Maxima and PIN-FORMED1 During Shoot Development. *Front Plant Sci* 12, 630792. doi:10.3389/fpls.2021.630792.

Schaaf, G., Honsbein, A., Meda, A. R., Kirchner, S., Wipf, D., and Wirén, N. von (2006). AtIREG2 Encodes a Tonoplast Transport Protein Involved in Iron-dependent Nickel Detoxification in Arabidopsis thaliana Roots *. *Journal of Biological Chemistry* 281, 25532–25540. doi:10.1074/jbc.M601062200.

Schauer, S. E., Jacobsen, S. E., Meinke, D. W., and Ray, A. (2002). DICER-LIKE1: blind men and elephants in Arabidopsis development. *Trends in Plant Science* 7, 487–491. doi:10.1016/S1360-1385(02)02355-5.

Schippers, J. H., Foyer, C. H., and van Dongen, J. T. (2016). Redox regulation in shoot growth, SAM maintenance and flowering. *Current Opinion in Plant Biology* 29, 121–128. doi:10.1016/j.pbi.2015.11.009.

Schmitz, G., and Theres, K. (2005). Shoot and inflorescence branching. *Curr Opin Plant Biol* 8, 506–511. doi:10.1016/j.pbi.2005.07.010.

Schneider, A., Godin, C., Boudon, F., Demotes-Mainard, S., Sakr, S., and Bertheloot, J. (2019). Light Regulation of Axillary Bud Outgrowth Along Plant Axes: An Overview of the Roles of Sugars and Hormones. *Front. Plant Sci.* 10, 1296. doi:10.3389/fpls.2019.01296.

Schommer, C., Debernardi, J. M., Bresso, E. G., Rodriguez, R. E., and Palatnik, J. F. (2014). Repression of Cell Proliferation by miR319-Regulated TCP4. *Molecular Plant* 7, 1533–1544. doi:10.1093/mp/ssu084.

Schulze, S., Schäfer, B. N., Parizotto, E. A., Voinnet, O., and Theres, K. (2010). LOST MERISTEMS genes regulate cell differentiation of central zone descendants in Arabidopsis shoot meristems: LOM genes control meristem maintenance. *The Plant Journal* 64, 668–678. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04359.x.

Sharma, A., Badola, P. K., Bhatia, C., Sharma, D., and Trivedi, P. K. (2020). Primary transcript of miR858 encodes regulatory peptide and controls flavonoid biosynthesis and development in Arabidopsis. *Nat. Plants* 6, 1262–1274. doi:10.1038/s41477-020-00769-x.

Sharrock, R. A., and Quail, P. H. (1989). Novel phytochrome sequences in Arabidopsis thaliana: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes Dev* 3, 1745–1757. doi:10.1101/gad.3.11.1745.

Shi, H., Yan, H., Li, J., and Tang, D. (2013). BSK1, a receptor-like cytoplasmic kinase, involved in both BR signaling and innate immunity in Arabidopsis. *Plant Signal Behav* 8, e24996. doi:10.4161/psb.24996.

Shi, J., Zhou, H., Liu, X., Wang, N., Xu, Q., and Yan, G. (2021). Correlation analysis of the transcriptome and metabolome reveals the role of the flavonoid biosynthesis pathway in regulating axillary buds in upland cotton (Gossypium hirsutum L.). *Planta* 254, 7. doi:10.1007/s00425-021-03597-1.

Shimizu, S., and Mori, H. (1998). Analysis of Cycles of Dormancy and Growth in Pea Axillary Buds Based on mRNA Accumulation Patterns of Cell Cycle-Related Genes. *Plant and Cell Physiology* 39, 255–262. doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a029365.

Singh, S. A., and Christendat, D. (2007). The DHQ-dehydroshikimate-SDH-shikimate-NADP(H) Complex: Insights into Metabolite Transfer in the Shikimate Pathway,. *Crystal Growth & Design* 7, 2153–2160. doi:10.1021/cg7007107.

Skabkin, M. A., Skabkina, O. V., Dhote, V., Komar, A. A., Hellen, C. U. T., and Pestova, T. V. (2010). Activities of Ligatin and MCT-1/DENR in eukaryotic translation initiation and ribosomal recycling. *Genes Dev* 24, 1787–1801. doi:10.1101/gad.1957510.

Snow, M., and Snow, R. (1942). The Determination of Axillary Buds. *The New Phytologist* 41, 13–22.

Snowden, K. C., Simkin, A. J., Janssen, B. J., Templeton, K. R., Loucas, H. M., Simons, J. L., et al. (2005). The Decreased apical dominance1/Petunia hybrida CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8 gene affects branch production and plays a role in leaf senescence, root growth, and flower development. *Plant Cell* 17, 746–759. doi:10.1105/tpc.104.027714.

Snyman, M. C., Solofoharivelo, M.-C., Souza-Richards, R., Stephan, D., Murray, S., and Burger, J. T. (2017). The use of high-throughput small RNA sequencing reveals differentially expressed microRNAs in response to aster yellows phytoplasma-infection in Vitis vinifera cv. “Chardonnay.” *PLoS One* 12, e0182629. doi:10.1371/journal.pone.0182629.

Somers, D., Sharrock, R., Tepperman, J., and Quail, P. (1992). The hy3 Long Hypocotyl Mutant of Arabidopsis Is Deficient in Phytochrome B. *The Plant cell* 3, 1263–1274. doi:10.1105/tpc.3.12.1263.

Song, X.-S., Gu, K.-X., Duan, X.-X., Xiao, X.-M., Hou, Y.-P., Duan, Y.-B., et al. (2018). Secondary amplification of siRNA machinery limits the application of spray-induced gene silencing. *Mol Plant Pathol* 19, 2543–2560. doi:10.1111/mpp.12728.

Sorefan, K., Booker, J., Haurogné, K., Goussot, M., Bainbridge, K., Foo, E., et al. (2003). MAX4 and RMS1 are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in Arabidopsis and pea. *Genes Dev* 17, 1469–1474. doi:10.1101/gad.256603.

Spinelli, S. V., Martin, A. P., Viola, I. L., Gonzalez, D. H., and Palatnik, J. F. (2011). A Mechanistic Link between STM and CUC1 during Arabidopsis Development1[C][W][OA]. *Plant Physiol* 156, 1894–1904. doi:10.1104/pp.111.177709.

Stafstrom, J. P., and Sussex, I. M. (1992). Expression of a ribosomal protein gene in axillary buds of pea seedlings. *Plant Physiol* 100, 1494–1502. doi:10.1104/pp.100.3.1494.

Steeves, T. A., and Sussex, I. M. (1989). *Patterns in Plant Development*. Cambridge University Press.

Steup, M., Robenek, H., and Melkonian, M. (1983). In-vitro degradation of starch granules isolated from spinach chloroplasts. *Planta* 158, 428–436. doi:10.1007/BF00397736.

Stirnberg, P., van de Sande, K., and Leyser, H. M. O. (2002). MAX1and MAX2 control shoot lateral branching in Arabidopsis. 12.

Sudawan, B., Chang, C.-S., Chao, H., Ku, M. S. B., and Yen, Y. (2016). Hydrogen cyanamide breaks grapevine bud dormancy in the summer through transient activation of gene expression and accumulation of reactive oxygen and nitrogen species. *BMC Plant Biol* 16, 202. doi:10.1186/s12870-016-0889-y.

Sun, D., Zhang, L., Yu, Q., Zhang, J., Li, P., Zhang, Y., et al. (2021). Integrated Signals of Jasmonates, Sugars, Cytokinins and Auxin Influence the Initial Growth of the Second Buds of Chrysanthemum after Decapitation. *Biology* 10, 440. doi:10.3390/biology10050440.

Sun, W., Xu, X. H., Wu, X., Wang, Y., Lu, X., Sun, H., et al. (2015). Genome-wide identification of microRNAs and their targets in wild type and phyB mutant provides a key link between microRNAs and the phyB-mediated light signaling pathway in rice. *Front. Plant Sci.* 6. doi:10.3389/fpls.2015.00372.

Sun, Z., Li, M., Zhou, Y., Guo, T., Liu, Y., Zhang, H., et al. (2018). Coordinated regulation of Arabidopsis microRNA biogenesis and red light signaling through Dicer-like 1 and phytochrome-interacting factor 4. *PLoS Genet* 14, e1007247. doi:10.1371/journal.pgen.1007247.

Sun, Z., Su, C., Yun, J., Jiang, Q., Wang, L., Wang, Y., et al. (2019). Genetic improvement of the shoot architecture and yield in soya bean plants via the manipulation of *GmmiR156b*. *Plant Biotechnol J* 17, 50–62. doi:10.1111/pbi.12946.

Sunkar, R., Girke, T., Jain, P. K., and Zhu, J.-K. (2005). Cloning and Characterization of MicroRNAs from Rice. *The Plant Cell* 17, 1397–1411. doi:10.1105/tpc.105.031682.

Sunkar, R., and Jagadeeswaran, G. (2008). In silico identification of conserved microRNAs in large number of diverse plant species. *BMC Plant Biol* 8, 37. doi:10.1186/1471-2229-8-37.

Sussex, I. M., and Kerk, N. M. (2001). The evolution of plant architecture. *Current Opinion in Plant Biology* 4, 33–37. doi:10.1016/S1369-5266(00)00132-1.

Suttle, J. (2009). Ethylene Is Not Involved in Hormone- and Bromoethane-Induced Dormancy Break in Russet Burbank Minitubers. *American Journal of Potato Research* 86. doi:10.1007/s12230-009-9081-3.

Tabara, M., Ohtani, M., Kanekatsu, M., Moriyama, H., and Fukuhara, T. (2018). Size Distribution of Small Interfering RNAs in Various Organs at Different Developmental Stages is Primarily Determined by the Dicing Activity of Dicer-Like Proteins in Plants. *Plant and Cell Physiology* 59, 2228–2238. doi:10.1093/pcp/pcy144.

Takeda, T., Suwa, Y., Suzuki, M., Kitano, H., Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., et al. (2003). The OsTB1 gene negatively regulates lateral branching in rice. *The Plant Journal* 33, 513–520. doi:10.1046/j.1365-313X.2003.01648.x.

Talbert, P. B., Adler, H. T., Parks, D. W., and Comai, L. (1995). The REVOLUTA gene is necessary for apical meristem development and for limiting cell divisions in the leaves and stems of Arabidopsis thaliana. 14.

Tanaka, M., Takei, K., Kojima, M., Sakakibara, H., and Mori, H. (2006). Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *The Plant Journal* 45, 1028–1036. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02656.x.

Tang, F., Chu, L., Shu, W., He, X., Wang, L., and Lu, M. (2019). Selection and validation of reference genes for quantitative expression analysis of miRNAs and mRNAs in Poplar. *Plant Methods* 15, 35. doi:10.1186/s13007-019-0420-1.

Teichmann, T., and Muhr, M. (2015). Shaping plant architecture. *Front. Plant Sci.* 6. doi:10.3389/fpls.2015.00233.

Thimann, K. V., and Skoog, F. (1933). Studies on the Growth Hormone of Plants: III. The Inhibiting Action of the Growth Substance on Bud Development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 19, 714–716. doi:10.1073/pnas.19.7.714.

Thomas, B., and Vince-Prue, D. (1997). *Photoperiodism in Plants*. Elsevier Science.

Tian, L., Liu, H., Ren, L., Ku, L., Wu, L., Li, M., et al. (2018). MicroRNA 399 as a potential integrator of photo-response, phosphate homeostasis, and sucrose signaling under long day condition. *BMC Plant Biol* 18, 290. doi:10.1186/s12870-018-1460-9.

Tivoli, B., Calonnec, A., Richard, B., Ney, B., and Andrivon, D. (2013). Current knowledge on plant/canopy architectural traits that reduce the expression and development of epidemics. *Eur J Plant Pathol* 135, 471–478. doi:10.1007/s10658-012-0066-6.

Tucker, D. J. (1976). ENDOGENOUS GROWTH REGULATORS IN RELATION TO SIDE SHOOT DEVELOPMENT IN THE TOMATO. *New Phytol* 77, 561–568. doi:10.1111/j.1469-8137.1976.tb04647.x.

Turnbull, C. G. N., Raymond, M. A. A., Dodd, I. C., and Morris, S. E. (1997). Rapid increases in cytokinin concentration in lateral buds of chickpea (Cicer arietinum L.) during release of apical dominance. *Planta* 202, 271–276. doi:10.1007/s004250050128.

Tyagi, S., Shumayla, Verma, P. C., Singh, K., and Upadhyay, S. K. (2020). Molecular characterization of ascorbate peroxidase (APX) and APX-related (APX-R) genes in Triticum aestivum L. *Genomics* 112, 4208–4223. doi:10.1016/j.ygeno.2020.07.023.

Tzin, V., and Galili, G. (2010). New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. *Mol Plant* 3, 956–972. doi:10.1093/mp/ssq048.

Umehara, M., Hanada, A., Magome, H., Takeda-Kamiya, N., and Yamaguchi, S. (2010). Contribution of Strigolactones to the Inhibition of Tiller Bud Outgrowth under Phosphate Deficiency in Rice. *Plant and Cell Physiology* 51, 1118–1126. doi:10.1093/pcp/pcq084.

Umehara, M., Hanada, A., Yoshida, S., Akiyama, K., Arite, T., Takeda-Kamiya, N., et al. (2008). Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* 455, 195–200. doi:10.1038/nature07272.

van der Knaap, E., Kim, J. H., and Kende, H. (2000). A Novel Gibberellin-Induced Gene from Rice and Its Potential Regulatory Role in Stem Growth1. *Plant Physiology* 122, 695–704. doi:10.1104/pp.122.3.695.

Vanneste, S., and Friml, J. (2009). Auxin: A Trigger for Change in Plant Development. *Cell* 136, 1005–1016. doi:10.1016/j.cell.2009.03.001.

Varet, H., Brillet-Guéguen, L., Coppée, J.-Y., and Dillies, M.-A. (2016). SARTools: A DESeq2- and EdgeR-Based R Pipeline for Comprehensive Differential Analysis of RNA-Seq Data. *PLoS ONE* 11, e0157022. doi:10.1371/journal.pone.0157022.

Varkonyi-Gasic, E., and Hellens, R. P. (2011). "Quantitative Stem-Loop RT-PCR for Detection of MicroRNAs," in *RNAi and Plant Gene Function Analysis* Methods in Molecular Biology., eds. H. Kodama and A. Komamine (Totowa, NJ: Humana Press), 145–157. doi:10.1007/978-1-61779-123-9_10.

Vaucheret, H. (2009). AGO1 Homeostasis Involves Differential Production of 21-nt and 22-nt miR168 Species by MIR168a and MIR168b. *PLoS ONE* 4, e6442. doi:10.1371/journal.pone.0006442.

Vaucheret, H., Vazquez, F., Crété, P., and Bartel, D. P. (2004). The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes Dev* 18, 1187–1197. doi:10.1101/gad.1201404.

Vergara, R., Parada, F., Rubio, S., and Pérez, F. J. (2012). Hypoxia induces H2O2 production and activates antioxidant defence system in grapevine buds through mediation of H2O2 and ethylene. *Journal of Experimental Botany* 63, 4123–4131. doi:10.1093/jxb/ers094.

Vernoux, T., Besnard, F., and Traas, J. (2010). Auxin at the shoot apical meristem. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a001487. doi:10.1101/cshperspect.a001487.

Voinnet, O. (2009). Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. *Cell* 136, 669–687. doi:10.1016/j.cell.2009.01.046.

Walla, A., Wilma van Esse, G., Kirschner, G. K., Guo, G., Brünje, A., Finkemeier, I., et al. (2020). An Acyl-CoA N-Acyltransferase Regulates Meristem Phase Change and Plant Architecture in Barley. *Plant Physiol* 183, 1088–1109. doi:10.1104/pp.20.00087.

Walton, E. F., Wu, R.-M., Richardson, A. C., Davy, M., Hellens, R. P., Thodey, K., et al. (2009). A rapid transcriptional activation is induced by the dormancy-breaking chemical hydrogen cyanamide in kiwifruit (Actinidia deliciosa) buds. *Journal of Experimental Botany* 60, 3835–3848. doi:10.1093/jxb/erp231.

Wang, C.-Y., Chen, Y.-Q., and Liu, Q. (2011). Sculpting the meristem: The roles of miRNAs in plant stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 409, 363–366. doi:10.1016/j.bbrc.2011.04.123.

Wang, H., Mao, Y., Yang, J., and He, Y. (2015a). TCP24 modulates secondary cell wall thickening and anther endothecium development. *Front Plant Sci* 6, 436. doi:10.3389/fpls.2015.00436.

Wang, H., and Wang, H. (2015). The miR156/SPL Module, a Regulatory Hub and Versatile Toolbox, Gears up Crops for Enhanced Agronomic Traits. *Molecular Plant* 8, 677–688. doi:10.1016/j.molp.2015.01.008.

Wang, J.-W., Czech, B., and Weigel, D. (2009). miR156-Regulated SPL Transcription Factors Define an Endogenous Flowering Pathway in Arabidopsis thaliana. *Cell* 138, 738–749. doi:10.1016/j.cell.2009.06.014.

Wang, L., Mai, Y.-X., Zhang, Y.-C., Luo, Q., and Yang, H.-Q. (2010). MicroRNA171c-Targeted SCL6-II, SCL6-III, and SCL6-IV Genes Regulate Shoot Branching in Arabidopsis. *Molecular Plant* 3, 794–806. doi:10.1093/mp/ssq042.

Wang, L., Xu, Y.-Y., Ma, Q.-B., Li, D., Xu, Z.-H., and Chong, K. (2006). Heterotrimeric G protein α subunit is involved in rice brassinosteroid response. *Cell Res* 16, 916–922. doi:10.1038/sj.cr.7310111.

Wang, M., Le Moigne, M.-A., Bertheloot, J., Crespel, L., Perez-Garcia, M.-D., Ogé, L., et al. (2019). BRANCHED1: A Key Hub of Shoot Branching. *Front. Plant Sci.* 10, 76. doi:10.3389/fpls.2019.00076.

Wang, M., Li, A., Liao, F., Qin, C., Chen, Z., Zhou, L., et al. (2022). Control of sucrose accumulation in sugarcane (Saccharum spp. hybrids) involves miRNA-mediated regulation of genes and transcription factors associated with sugar metabolism. *GCB Bioenergy* 14. doi:10.1111/gcbb.12909.

Wang, M., Pérez-Garcia, M.-D., Davière, J.-M., Barbier, F., Ogé, L., Gentilhomme, J., et al. (2021a). Outgrowth of the axillary bud in rose is controlled by sugar metabolism and signalling. *Journal of Experimental Botany* 72, 3044–3060. doi:10.1093/jxb/erab046.

Wang, M., Zang, L., Jiao, F., Perez-Garcia, M.-D., Ogé, L., Hamama, L., et al. (2020a). Sugar Signaling and Post-transcriptional Regulation in Plants: An Overlooked or an Emerging Topic? *Front. Plant Sci.* 11, 578096. doi:10.3389/fpls.2020.578096.

Wang, Q., Hasson, A., Rossmann, S., and Theres, K. (2016). Divide et impera: boundaries shape the plant body and initiate new meristems. *New Phytologist* 209, 485–498. doi:10.1111/nph.13641.

Wang, R., Yang, X., Guo, S., Wang, Z., Zhang, Z., and Fang, Z. (2021b). MiR319-targeted OsTCP21 and OsGAmyb regulate tillering and grain yield in rice. *Journal of Integrative Plant Biology* 63, 1260–1272. doi:10.1111/jipb.13097.

Wang, S., Liu, S., Liu, L., Li, R., Guo, R., Xia, X., et al. (2020b). miR477 targets the phenylalanine ammonia-lyase gene and enhances the susceptibility of the tea plant (Camellia sinensis) to disease during Pseudopestalotiopsis species infection. *Planta* 251, 59. doi:10.1007/s00425-020-03353-x.

Wang, Y., and Jiao, Y. (2018). Axillary meristem initiation — a way to branch out. *Current Opinion in Plant Biology* 41, 61–66. doi:10.1016/j.pbi.2017.09.001.

Wang, Y., Sun, S., Zhu, W., Jia, K., Yang, H., and Wang, X. (2013). Strigolactone/MAX2-Induced Degradation of Brassinosteroid Transcriptional Effector BES1 Regulates Shoot Branching. *Developmental Cell* 27, 681–688. doi:10.1016/j.devcel.2013.11.010.

Wang, Y., Wang, J., Shi, B., Yu, T., Qi, J., Meyerowitz, E. M., et al. (2014). The Stem Cell Niche in Leaf Axils Is Established by Auxin and Cytokinin in Arabidopsis. *Plant Cell* 26, 2055–2067. doi:10.1105/tpc.114.123083.

Wang, Y., Wang, Z., Amyot, L., Tian, L., Xu, Z., Gruber, M. Y., et al. (2015b). Ectopic expression of miR156 represses nodulation and causes morphological and developmental changes in Lotus japonicus. *Mol Genet Genomics* 290, 471–484. doi:10.1007/s00438-014-0931-4.

Waters, M. T., Gutjahr, C., Bennett, T., and Nelson, D. C. (2017). Strigolactone Signaling and Evolution. *Annual Review of Plant Biology* 68, 291–322. doi:10.1146/annurev-arplant-042916-040925.

Weber, M. J. (2004). New human and mouse microRNA genes found by homology search: New human and mouse microRNA gene. *FEBS Journal* 272, 59–73. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04389.x.

Wei, S., Gruber, M. Y., Yu, B., Gao, M.-J., Khachatourians, G. G., Hegedus, D. D., et al. (2012). Arabidopsis mutant sk156 reveals complex regulation of SPL15 in a miR156-controlled gene network. *BMC Plant Biol* 12, 169. doi:10.1186/1471-2229-12-169.

Wei, S., Yu, B., Gruber, M. Y., Khachatourians, G. G., Hegedus, D. D., and Hannoufa, A. (2010). Enhanced Seed Carotenoid Levels and Branching in Transgenic *Brassica napus* Expressing the *Arabidopsis miR156b* Gene. *J. Agric. Food Chem.* 58, 9572–9578. doi:10.1021/jf102635f.

Wickson, M., and Thimann, K. V. (1958). The Antagonism of Auxin and Kinetin in Apical Dominance. *Physiologia Plantarum* 11, 62–74. doi:10.1111/j.1399-3054.1958.tb08426.x.

Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. *Cell* 75, 855–862. doi:10.1016/0092-8674(93)90530-4.

Wintz, H., Fox, T., Wu, Y.-Y., Feng, V., Chen, W., Chang, H.-S., et al. (2003). Expression Profiles of Arabidopsis thaliana in Mineral Deficiencies Reveal Novel Transporters Involved in Metal Homeostasis *. *Journal of Biological Chemistry* 278, 47644–47653. doi:10.1074/jbc.M309338200.

Wu, G. (2013). Plant MicroRNAs and Development. *Journal of Genetics and Genomics* 40, 217–230. doi:10.1016/j.jgg.2013.04.002.

Wu, L., Yu, J., Shen, Q., Huang, L., Wu, D., and Zhang, G. (2018). Identification of microRNAs in response to aluminum stress in the roots of Tibetan wild barley and cultivated barley. *BMC Genomics* 19, 560. doi:10.1186/s12864-018-4953-x.

Wu, W., Li, J., Wang, Q., Lv, K., Du, K., Zhang, W., et al. (2021). Growth-regulating factor 5 (GRF5)-mediated gene regulatory network promotes leaf growth and expansion in poplar. *New Phytologist* 230, 612–628. doi:10.1111/nph.17179.

Xi, L., Wen, C., Fang, S., Chen, X., Nie, J., Chu, J., et al. (2015). Impacts of strigolactone on shoot branching under phosphate starvation in chrysanthemum (Dendranthema grandiflorum cv. Jinba). *Frontiers in Plant Science* 6. Available at: https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2015.00694.

Xia, X., Dong, H., Yin, Y., Song, X., Gu, X., Sang, K., et al. (2021). Brassinosteroid signaling integrates multiple pathways to release apical dominance in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 118, e2004384118. doi:10.1073/pnas.2004384118.

Xie, Y., Liu, Y., Wang, H., Ma, X., Wang, B., Wu, G., et al. (2017). Phytochrome-interacting factors directly suppress MIR156 expression to enhance shade-avoidance syndrome in Arabidopsis. *Nat Commun* 8, 348. doi:10.1038/s41467-017-00404-y.

Xie, Z., Kasschau, K. D., and Carrington, J. C. (2003). Negative Feedback Regulation of Dicer-Like1 in Arabidopsis by microRNA-Guided mRNA Degradation. *Current Biology* 13, 784–789. doi:10.1016/S0960-9822(03)00281-1.

Xie, Z., Khanna, K., and Ruan, S. (2010). Expression of microRNAs and its regulation in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 21, 790–797. doi:10.1016/j.semcdb.2010.03.012.

Xu, J., Li, Y., Wang, Y., Liu, X., and Zhu, X.-G. (2017). Altered expression profiles of microRNA families during de-etiolation of maize and rice leaves. *BMC Research Notes* 10, 108. doi:10.1186/s13104-016-2367-x.

Xu, J., Zha, M., Li, Y., Ding, Y., Chen, L., Ding, C., et al. (2015). The interaction between nitrogen availability and auxin, cytokinin, and strigolactone in the control of shoot branching in rice (Oryza sativa L.). *Plant Cell Rep* 34, 1647–1662. doi:10.1007/s00299-015-1815-8.

Xu, M., Hu, T., Zhao, J., Park, M.-Y., Earley, K. W., Wu, G., et al. (2016). Developmental Functions of miR156-Regulated SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) Genes in Arabidopsis thaliana. *PLOS Genetics* 12, e1006263. doi:10.1371/journal.pgen.1006263.

Xu, P., Cai, X.-T., Wang, Y., Xing, L., Chen, Q., and Xiang, C.-B. (2014). HDG11 upregulates cell-wall-loosening protein genes to promote root elongation in Arabidopsis. *J Exp Bot* 65, 4285–4295. doi:10.1093/jxb/eru202.

Xu, W., Purugganan, M. M., Polisensky, D. H., Antosiewicz, D. M., Fry, S. C., and Braam, J. (1995). Arabidopsis TCH4, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase. *Plant Cell* 7, 1555–1567. doi:10.1105/tpc.7.10.1555.

Yan, H., Zhao, Y., Shi, H., Li, J., Wang, Y., and Tang, D. (2018). BRASSINOSTEROID-SIGNALING KINASE1 Phosphorylates MAPKKK5 to Regulate Immunity in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 176, 2991–3002. doi:10.1104/pp.17.01757.

Yan, Y., Shi, Q., and Gong, B. (2021a). S-nitrosoglutathione Reductase-Mediated Nitric Oxide Affects Axillary Buds Outgrowth of Solanum lycopersicum L. by Regulating Auxin and Cytokinin Signaling. *Plant and Cell Physiology* 62, 458–471. doi:10.1093/pcp/pcab002.

Yan, Y., Wei, M., Li, Y., Tao, H., Wu, H., Chen, Z., et al. (2021b). MiR529a controls plant height, tiller number, panicle architecture and grain size by regulating SPL target genes in rice (Oryza sativa L.). *Plant Science* 302, 110728. doi:10.1016/j.plantsci.2020.110728.

Yang, L., Xu, M., Koo, Y., He, J., and Poethig, R. S. (2013). Sugar promotes vegetative phase change in Arabidopsis thaliana by repressing the expression of MIR156A and MIR156C. *Elife* 2, e00260. doi:10.7554/eLife.00260.

Yang, S. F., and Pratt, H. K. (2019). "The Physiology of Ethylene in Wounded Plant Tissues," in *The Physiology of Ethylene in Wounded Plant Tissues* (De Gruyter), 595–622. doi:10.1515/9783111671062-020.

Yang, T., Wang, Y., Teotia, S., Wang, Z., Shi, C., Sun, H., et al. (2019). The interaction between miR160 and miR165/166 in the control of leaf development and drought tolerance in Arabidopsis. *Scientific Reports* 9. doi:10.1038/s41598-019-39397-7.

Yang, T., Wang, Y., Teotia, S., Zhang, Z., and Tang, G. (2018). The Making of Leaves: How Small RNA Networks Modulate Leaf Development. *Front. Plant Sci.* 9, 824. doi:10.3389/fpls.2018.00824.

Yang, W., Schuster, C., Beahan, C. T., Charoensawan, V., Peaucelle, A., Bacic, A., et al. (2016). Regulation of Meristem Morphogenesis by Cell Wall Synthases in Arabidopsis. *Curr Biol* 26, 1404–1415. doi:10.1016/j.cub.2016.04.026.

Yao, C., and Finlayson, S. A. (2015). Abscisic Acid Is a General Negative Regulator of Arabidopsis Axillary Bud Growth. *Plant Physiol.* 169, 611–626. doi:10.1104/pp.15.00682.

Yeang, A. Y., and Hillman, J. R. (1984). Ethylene and apical dominance. *Physiol Plant* 60, 275–282. doi:10.1111/j.1399-3054.1984.tb06062.x.

Yu, C.-W., Lin, Y.-T., and Li, H. (2020). Increased ratio of galactolipid MGDG : DGDG induces jasmonic acid overproduction and changes chloroplast shape. *New Phytologist* 228, 1327–1335. doi:10.1111/nph.16766.

Yu, S., and Wang, J.-W. (2020). The Crosstalk between MicroRNAs and Gibberellin Signaling in Plants. *Plant Cell Physiol* 61, 1880–1890. doi:10.1093/pcp/pcaa079.

Yue, E., Liu, Z., Li, C., Li, Y., Liu, Q., and Xu, J.-H. (2017). Overexpression of miR529a confers enhanced resistance to oxidative stress in rice (Oryza sativa L.). *Plant Cell Rep* 36, 1171–1182. doi:10.1007/s00299-017-2146-8.

Žádníková, P., and Simon, R. (2014). How boundaries control plant development. *Curr Opin Plant Biol* 17, 116–125. doi:10.1016/j.pbi.2013.11.013.

Zha, M., Imran, M., Wang, Y., Xu, J., Ding, Y., and Wang, S. (2019). Transcriptome analysis revealed the interaction among strigolactones, auxin, and cytokinin in controlling the shoot branching of rice. *Plant Cell Rep* 38, 279–293. doi:10.1007/s00299-018-2361-y.

Zhan, J., Chu, Y., Wang, Y., Diao, Y., Zhao, Y., Liu, L., et al. (2021). The miR164-GhCUC2-GhBRC1 module regulates plant architecture through abscisic acid in cotton. *Plant Biotechnol J* 19, 1839–1851. doi:10.1111/pbi.13599.

Zhang, B., and Chen, X. (2021). Secrets of the MIR172 family in plant development and flowering unveiled. *PLOS Biology* 19, e3001099. doi:10.1371/journal.pbio.3001099.

Zhang, B., Pan, X., Cannon, C. H., Cobb, G. P., and Anderson, T. A. (2006a). Conservation and divergence of plant microRNA genes. *The Plant Journal* 46, 243–259. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02697.x.

Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., and Anderson, T. A. (2006b). Plant microRNA: A small regulatory molecule with big impact. *Developmental Biology* 289, 3–16. doi:10.1016/j.ydbio.2005.10.036.

Zhang, H., He, H., Wang, X., Wang, X., Yang, X., Li, L., et al. (2011). Genome-wide mapping of the HY5-mediated genenetworks in Arabidopsis that involve both transcriptional and post-transcriptional regulation: Regulation of HY5-mediated gene networks. *The Plant Journal* 65, 346–358. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04426.x.

Zhang, Y.-C., Yu, Y., Wang, C.-Y., Li, Z.-Y., Liu, Q., Xu, J., et al. (2013). Overexpression of microRNA OsmiR397 improves rice yield by increasing grain size and promoting panicle branching. *Nat Biotechnol* 31, 848–852. doi:10.1038/nbt.2646.

Zhang, Z., and Zhang, X. (2012). Argonautes compete for miR165/166 to regulate shoot apical meristem development. *Current Opinion in Plant Biology* 15, 652–658. doi:10.1016/j.pbi.2012.05.007.

Zhao, J.-P., Jiang, X.-L., Zhang, B.-Y., and Su, X.-H. (2012). Involvement of microRNA-Mediated Gene Expression Regulation in the Pathological Development of Stem Canker Disease in Populus trichocarpa. *PLOS ONE* 7, e44968. doi:10.1371/journal.pone.0044968.

Zhao, Q., Nakashima, J., Chen, F., Yin, Y., Fu, C., Yun, J., et al. (2013). *LACCASE* Is Necessary and Nonredundant with *PEROXIDASE* for Lignin Polymerization during Vascular Development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 25, 3976–3987. doi:10.1105/tpc.113.117770.

Zhao, T., Xu, X., Wang, M., Li, C., Li, C., Zhao, R., et al. (2019). Identification and profiling of upland cotton microRNAs at fiber initiation stage under exogenous IAA application. *BMC Genomics* 20, 421. doi:10.1186/s12864-019-5760-8.

Zhao, X., Wen, B., Li, C., Tan, Q., Liu, L., Chen, X., et al. (2021). Overexpression of the Peach Transcription Factor Early Bud-Break 1 Leads to More Branches in Poplar. *Front Plant Sci* 12, 681283. doi:10.3389/fpls.2021.681283.

Zhao, Y., Wen, H., Teotia, S., Du, Y., Zhang, J., Li, J., et al. (2017). Suppression of microRNA159 impacts multiple agronomic traits in rice (Oryza sativa L.). *BMC Plant Biol* 17, 215. doi:10.1186/s12870-017-1171-7.

Zhou, B., Fan, P., Li, Y., Yan, H., and Xu, Q. (2016). Exploring miRNAs involved in blue/UV-A light response in Brassica rapa reveals special regulatory mode during seedling development. *BMC Plant Biol* 16, 111. doi:10.1186/s12870-016-0799-z.

Zhou, C., Han, L., Fu, C., Wen, J., Cheng, X., Nakashima, J., et al. (2013a). The Trans-Acting Short Interfering RNA3 Pathway and NO APICAL MERISTEM Antagonistically Regulate Leaf Margin Development and Lateral Organ Separation, as Revealed by Analysis of an argonaute7/lobed leaflet1 Mutant in Medicago truncatula. *The Plant Cell* 25, 4845–4862. doi:10.1105/tpc.113.117788.

Zhou, M., Li, D., Li, Z., Hu, Q., Yang, C., Zhu, L., et al. (2013b). Constitutive Expression of a *miR319* Gene Alters Plant Development and Enhances Salt and Drought Tolerance in Transgenic Creeping Bentgrass. *Plant Physiol.* 161, 1375–1391. doi:10.1104/pp.112.208702.

Zhou, Y., Yan, A., Han, H., Li, T., Geng, Y., Liu, X., et al. (2018). HAIRY MERISTEM with WUSCHEL confines CLAVATA3 expression to the outer apical meristem layers. *Science* 361, 502–506. doi:10.1126/science.aar8638.

Zhu, J.-K. (2008). Reconstituting plant miRNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 9851–9852. doi:10.1073/pnas.0805207105.

Zhu, Q.-H., and Helliwell, C. A. (2011). Regulation of flowering time and floral patterning by miR172. *J Exp Bot* 62, 487–495. doi:10.1093/jxb/erq295.

Zou, J., Zhang, S., Zhang, W., Li, G., Chen, Z., Zhai, W., et al. (2006). The rice HIGH-TILLERING DWARF1 encoding an ortholog of Arabidopsis MAX3 is required for negative regulation of the outgrowth of axillary buds. *The Plant Journal* 48, 687–698. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02916.x.

Zou, Y., Chen, G., Jin, J., Wang, Y., Xu, M., Peng, J., et al. (2020). Small RNA and Transcriptome Sequencing Reveals miRNA Regulation of Floral Thermogenesis in Nelumbo nucifera. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 3324. doi:10.3390/ijms21093324.

Annexes

Annexe 1 : Validation des conditions expérimentales

Il a été montré par Girault et al. (2008), que le débourrement des bourgeons chez le rosier est totalement inhibé à l'obscurité alors que le débourrement a lieu lorsque les plantes sont exposées à la lumière (Figure 6). Ce débourrement est caractérisé par l'élongation des bourgeons et la reprise de l'activité d'organogénèse. Ces résultats ont été caractérisés sur des plantes défoliées après décapitation et placées sous sac opaque pour la condition obscurité et sans sac plastique pour la condition lumière. Afin de valider nos conditions expérimentales, et obtenir une cinétique pour le bourgeon 3, nous avons suivi son allongement et son organogenèse au cours du temps.

Nous observons clairement une augmentation du nombre de pièces foliaires dans le bourgeon 3 pour les plantes sous condition de lumière, avec 8 pièces foliaires comptabilisées à t0 immédiatement après décapitation contre 13 pièces foliaires en moyenne à 96 heures après décapitation (t96), les mesures à 72h et 96h étant significativement différentes par rapport au t0. A l'inverse, le nombre de pièces foliaires n'augmente pas pour les plantes traitées en condition d'obscurité (Figure A).

La longueur du bourgeon 3 de plantes placées à la lumière ou à l'obscurité pendant 4 jours après décapitation a été suivie. Nous pouvons observer une augmentation de la longueur moyenne du bourgeon pour les plantes traitées à la lumière, passant de 1.5 mm (t0) à 3.5 mm (t96) avec les points 48h, 72h et 96h significativement différents comparés au point t0. A l'inverse, aucune augmentation significative de la longueur du bourgeon 3 n'est observée pour les plantes se développant à l'obscurité (Figure B).

Nous validons bien, dans nos conditions de culture sous sacs, que nous reproduisons une dynamique de croissance (augmentation de l'organogenèse et élongation) chez le bourgeon 3 de plantes placées à la lumière identique à celle décrite par Girault en 2008 pour le bourgeon 4, alors qu'aucune croissance n'est observée à l'obscurité.

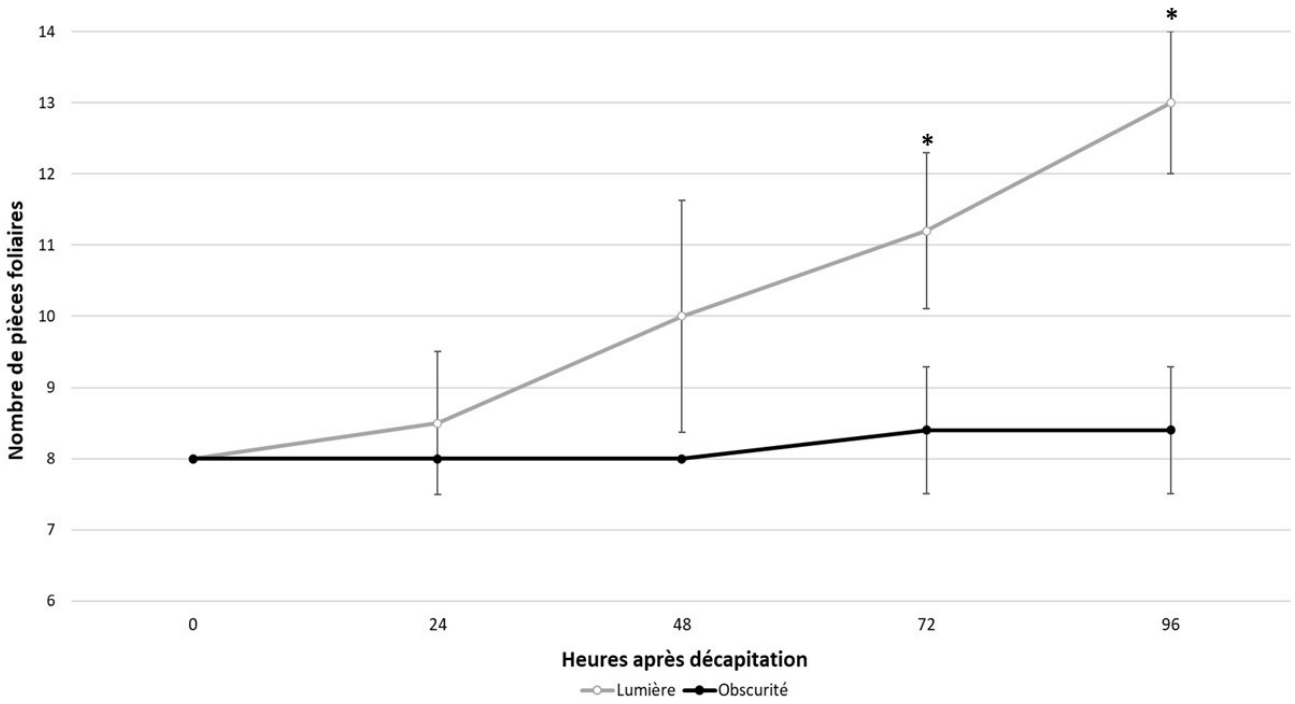

Figure A : Nombre moyen de pièces foliaires (primordia, jeunes feuilles et écailles) par bourgeon axillaire 3 de plantes *Rosa* 'Radrazz' juste après décapitation (t0) et après 24, 48, 72 ou 96h à la lumière ou à l'obscurité.

Chaque valeur représente la moyenne ± écart-type, avec n = 4 à 5 plantes. L'astérisque représente les différences significatives par rapport à la condition de référence t0 ($p \leq 0.05$). Les tests statistiques réalisés sont des Anova ou Kruskall test (avec des tests post-hoc pairwise.t.test ou test de Wilcoxon).

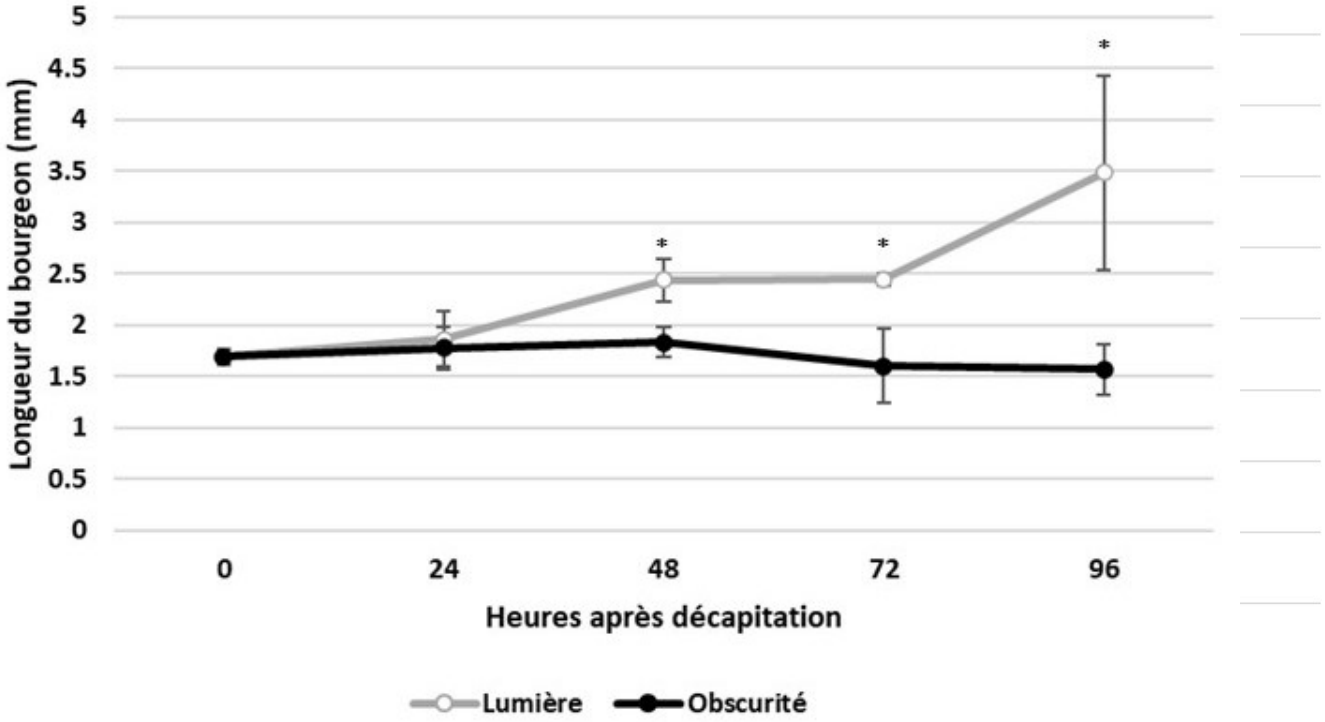

Figure B : Évolution de la longueur (en mm) du bourgeon axillaire 3 de plantes *Rosa* 'Radrazz' juste après décapitation (t0) et après 24, 48, 72 ou 96h à la lumière ou à l'obscurité.

Chaque valeur représente la moyenne ± écart-type, avec n = 4 à 5 plantes. L'astérisque représente les différences significatives par rapport à la condition de référence t0 ($p \leq 0.05$). Les tests statistiques réalisés sont des Anova ou Kruskall test (avec des tests post-hoc pairwise.t.test ou test de Wilcoxon).

Annexe 2 : Protocole détaillé extraction au CTAB

Ce protocole est issu de la publication de Barbier et al., 2019a. Ce protocole ne demande ni phénol ni chloroforme et est conseillé pour l'extraction d'échantillons "difficiles" comme les bourgeons de rosiers.

Produits chimiques :

- Hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB)
- Chlorure de sodium (NaCl)
- Polyvinylpyrrolidone 40 (PVP 40)
- Acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA, 0.5M, pH 8)
- Tris(hydroxyméthyl)aminométhane (TRIS, 1M, pH 8)
- Dodécylsulfate de sodium (SDS) 10%
- Isopropanol glacé (stocké à -20°C)
- Ethanol 70% glacé (stocké à -20°C)
- Dithiothréitol (DTT, 0.5mM)
- Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)
- DNase I et tampon DNase (M0303S - New England BioLabs)

Tampons :

- Préparation de 500mL de tampon CTAB (Tableau)

Produits chimiques	Concentration finale	Quantités pour 500 ml de tampon
CTAB	2%	10 g
NaCl	1.4 M	40,6 g
EDTA	20 mM	20 ml
TRIS	100 mM	50 ml
PVP40	2%	10g
MgCl2	5 mM	0.24 g
Eau ultrapure		qsp 500mL

Protocole :

Lyse des tissus

- Placer entre 5 à 100mg de tissus broyés dans un tube de 2mL
- Ajouter 625µl de CTAB et 25µl de DTT 0.5mM (préalablement mélanger le CTAB et le DTT avant)
- Vortexer le tube et incuber à 60°C pendant 15 minutes. Vortexer toutes les 5 minutes.
- Ajouter 65µl de SDS et vortexer
- Centrifuger à 14000 rpm pendant 10 minutes
- Prélever doucement la phase liquide (entre 450-500µl) et la transférer dans un tube 1.5 ml
- Centrifuger à 14000 rpm pendant 10 minutes
- Prélever le surnageant (400-450 µl) et le transférer dans un nouveau tube 1.5 ml

Précipitation des acides nucléiques

- Ajouter 400 µl d'isopropanol glacé et vortexer
- Laisser le tube 15 minutes à -20°C
- Centrifuger à 4°C pendant 45 minutes à 14000 rpm
- Renverser le tube pour enlever l'isopropanol
- Ajouter 500µl d'éthanol 70% glacé
- Centrifuger à 4°C pendant 10 minutes à 14000 rpm
- Renverser le tube pour enlever l'éthanol
- Centrifuger rapidement pour enlever les traces d'éthanol
- Sécher en plaçant le tube à 50-60°C pendant 2-3 minutes

Suppression de l'ADN

- Ajouter 90 µl d'eau ultrapure RNase-free et pipeter pour resuspendre le culot
- Placer le tube à 50-60°C pendant 2-3 minutes, vortexer et centrifuger rapidement
- Faire un mix avec 3 µl de DNase et 10 µl de tampon DNase
- Ajouter le mix et vortexer rapidement
- Incuber pendant 30 minutes à 37°C, mélanger toutes les 10 minutes

Purification des ARNs

- Ajouter 10µl de NaCl et pipeter pour resuspendre le culot
- Ajouter 110 µl d'isopropanol glacé et vortexer
- Centrifuger à 4°C pendant 45 minutes à 14000 rpm
- Renverser le tube pour enlever l'isopropanol
- Ajouter 500µl d'éthanol 70% glacé
- Centrifuger à 4°C pendant 10 minutes à 14000 rpm
- Renverser le tube pour enlever l'éthanol
- Centrifuger rapidement pour enlever les traces d'éthanol
- Sécher en plaçant le tube à 50-60°C pendant 2-3 minutes
- Ajouter entre 30 à 70 µl d'eau RNase free et pipeter pour resuspendre le culot
- Placer le tube à 50-60°C pendant 3 à 5 minutes, vortexer et centrifuger brièvement
- Détermine la quantité et qualité des ARNs au Nanodrop
- Stocker les échantillons à -80°C

Annexe 3 : Listes des amorces utilisées pour les qPCR.

Tableau 1 : Séquence des amorces utilisées pour la RT stem-loop et qPCR. Fw : amorce sens ; Rev : amorce antisens ; SL : stem-loop ; RT : Reverse Transcription (Transcription Inverse) ; Tm : température de fusion

Catégorie	Nom	Numéro d'accession	Amorces	Tm (°C)
RT stem-loop	miR160_RT	-	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTC GCACTGGATACGACTGCCTG	-
RT stem-loop	miR162a-3p_RT	-	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTC GCACTGGATACGACCTGGAT	-
RT stem-loop	miR166u_RT	-	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTA TTCGCACTGGATACGACGAATGA	-
RT stem-loop	miR319a_1_RT	-	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTC GCACTGGATACGACAGGGAG	-
RT stem-loop	miR319b_1_RT	-	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTC GCACTGGATACGACAGGAGC	-
RT stem-loop	miR396a-5p_RT	-	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTC GCACTGGATACGACCAGTTC	-
RT stem-loop	miR396b_RT	-	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTC GCACTGGATACGACAGTTCA	-
RT stem-loop	RhU6_RT		GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTC GCACTGGATACGACATTTGG	
qPCR	RhU6_Fw_SL		CGGGCATAAATCGAGAAATGGT	58.4
qPCR	miR396a-5p_Fw_SL	-	GCGGCGTTCCACAGCTTTCTT	61.8
qPCR	miR396b_Fw_SL	-	GCGGCGTTCCACAGCTTTCT	61.4
qPCR	miR160_Fw_SL	-	GCGGCGTGGCATACAGGGAGC	67.6
qPCR	miR162a-3p_Fw_SL	-	GCGGCGTCGATAAACCTCTGC	63.7
qPCR	miR166u_Fw_SL	-	GCGGCGTCTCGGACCAGGCT	67.6
qPCR	miR319a_1-Fw_SL	-	GCGGCGTTGGACTGAAGGGAG	65.7
qPCR	miR319b_1_Fw_SL	-	GCGGCGCTTGGACTGAAGGGA	65.7
qPCR	Amorce rev universelle stem-loop	-	GTGCAGGGTCCGAGGT	56.9
qPCR	UBC_Fw	RC7G0173600	GCCAGAGATTGCCCATATGTA	57.9
qPCR	UBC_Rev	RC7G0173600	TCACAGAGTCCTAGCAGCACA	59.8
qPCR	PDB1_Fw	RC7G0209800	CGTGTTGTTGGTTGTCCAAG	57.3
qPCR	PDB1_Rev	RC7G0209800	GAAGATCTGCCATCCCCATA	57.3
qPCR	SUI_Fw	RC6G0009300	GCTCAAGAGAACCGTCAAGG	59.4

qPCR	SUI_Rev	RC6G0009300	GGGCATAAACTGTGGGAAAA	55.2
qPCR	pre-miR319a_1_1_Fw	RC7G0175600	CACCGTATTAGTGGTATTGAAGGAAGGG	65.1
qPCR	pre-miR319a_1_1_Rev	RC7G0175600	TAAGAGGGAATTAGATAAGGGAGC	59.3
qPCR	pre-miR319a_1_2_Fw	RC5G0635700	CACCCTTGCTTGTTATGATGCAGAAGG	65
qPCR	pre-miR319a_1_2_Rev	RC5G0635700	GGATGAGAACACCTATGTGAC	57.9
qPCR	pre-miR319b_1_Fw	RC1G0499800	CACCTAGTGCATGTGAATTGTCAGAG	63.2
qPCR	pre-miR319b_1_Rev	RC1G0499800	GCCTGGAAATTAAGTAAGGAAGAG	59.3
qPCR	pre-miR396a-5p_Fw	RC2G0032700	CACCCCGTTCTCTGTTTCTGATTGGTG	66.5
qPCR	pre-miR396a-5p_Rev	RC2G0032700	TGATCTGAAGAGATCGTCTTCTG	
qPCR	GRF1A_Fw	RC2G0220500	CTGCGAGAGGCACATTAACA	57.3
qPCR	GRF1A_Rev	RC2G0220500	GGCTCCAAGCTTTTGAACTG	57.3
qPCR	GRF1B_Fw	RC6G0581400	TTGGCCTAAAAACCCATCTG	55.2
qPCR	GRF1B_Rev	RC6G0581400	GTGAGCTTCCCATTGTTGGT	57.3
qPCR	GRF2_Fw	RC7G0327700	GGGATAGTGAAGCGTGGAAA	57.3
qPCR	GRF2_Rev	RC7G0327700	TTCCGATGAGGAATTCAAGG	55.2
qPCR	GRF3_Fw	RC3G0236600	AAGTTGTCTACCGGCAATGG	57.3
qPCR	GRF3_Rev	RC3G0236600	TTCATTGACAGAGCCACGAG	57.3
qPCR	GRF5A_Fw	RC1G0598900	TTCCGGAACCAATCAGTCTC	57.3
qPCR	GRF5A_Rev	RC1G0598900	AATGAGGCAATTCTCGATGG	55.2
qPCR	GRF5B_Fw	RC0G0131600	CCCCAGAGCTGTTGTCTCTC	61.4
qPCR	GRF5B_Rev	RC0G0131600	AAGGGTGGTGAGGGAAGAGT	59.4
qPCR	GRF6_Fw	RC2G0093600	AGACCCAGAACCAGGAAGGT	59.4
qPCR	GRF6_Rev	RC2G0093600	TGATGTTGGTGGTGTTGCTT	55.2
qPCR	GRF7_Fw	RC1G0584300	ATGCTTGGTCCAAAAACGAC	55.2
qPCR	GRF7_Rev	RC1G0584300	AGGTCGAGACTCGTGGCTTA	59.4
qPCR	GRF8_Fw	RC7G0098100	GTTCCATGGTGACTCCTGCT	59.4
qPCR	GRF8_Rev	RC7G0098100	CTCTGCAGACCTTGGCTACC	61.4
qPCR	GRF9_Fw	RC1G0304400	AGTCACTTCTCCTCCCAGCA	59.4
qPCR	GRF9_Rev	RC1G0304400	GGGGTAACAGCGGTTCTGTA	59.4
qPCR	TCP2_Fw	RC5G0134300	TTCCCGACTACATCCCTGTC	59.4
qPCR	TCP2_Rev	RC5G0134300	CTGGAGGTGAGGCAAAAGAG	59.4
qPCR	TCP4_Fw	RC5G0279600	AATGGCAGAGCCTTTTGCTA	55.2
qPCR	TCP4_Rev	RC5G0279600	AGGGCCTGTGAGTTTCCTTT	57.3

Tableau 2 : Séquence des amorces utilisées pour la qPCR sur *Arabidopsis*. Fw : amorce sens ; Rev : amorce antisens ; SL : stem-loop ; RT : Reverse Transcription (Transcription Inverse) ; Tm : température.

Catégorie	Nom	Numéro d'accession	Amorces	Tm (°C)
qPCR	athpre-miR319a_Fw	AT4G23713	TGAGTCCATTCACAGGTCGTG	59.8
qPCR	athpre-miR319a_Rev	AT4G23713	TTGGCGACTCGGTATTTGGA	57.3
qPCR	athpre-miR319b_Fw	AT5G41663	GAGCTTTCTTCGGTCCACTCA	59.8
qPCR	athpre-miR319b_Rev	AT5G41663	GCTCCCTTCAGTCCAAGCAT	59.4
qPCR	athpre-miR396a_Fw	AT2G10606	GCTTTCTTGAACTGCAAAACTTCT	57.6
qPCR	athpre-miR396a_Rev	AT2G10606	ACCGCAAATCAATCGAGCAG	57.3
qPCR	athTCP2_Fw	AT4G18390	AATTCTCGGGTCGGGTCAAC	59.4
qPCR	athTCP2_Rev	AT4G18390	CAAGATTGAATGCTCCGCCG	59.4
qPCR	athTCP3_Fw	AT1G53230	CCGCCGATACTCTTCGTCAA	59.4
qPCR	athTCP3_Rev	AT1G53230	TGCGTTGAAGCTACCGGAAA	57.3
qPCR	athTCP4_Fw	AT3G15030	CCAAGATCTCCGTCTCTCGC	61.4
qPCR	athTCP4_Rev	AT3G15030	CTGCTCCCAACTCGATGTGT	59.4
qPCR	athTCP10_Fw	AT2G31070	ACAACACCACCACCAAACCT	57.3
qPCR	athTCP10_Rev	AT2G31070	TGGTCTCGGGAACTACGACT	59.4
qPCR	athTCP24_Fw	AT1G30210	ACCCGGTTCAGCTGCAAATA	57.3
qPCR	athTCP24_Rev	AT1G30210	GTGGTCAAGAGGTGGAGGTG	61.4
qPCR	athGRF1_Fw	AT2G22840	CGTCGCATAAACAAGCCTCG	59.4
qPCR	athGRF1_Rev	AT2G22840	TAATCCCATGTGGATCGCGG	59.4
qPCR	athGRF2_Fw	AT4G37740	CTTGGCCTGAAGAGCTGACA	59.4
qPCR	athGRF2_Rev	AT4G37740	GTGTGTGGAGGAAGGGGATG	61.4
qPCR	athGRF3_Fw	AT2G36400	CCATACGAGTCCCACATCGG	61.4
qPCR	athGRF3_Rev	AT2G36400	CTGAGCTCATGGGGCTTGAA	59.4
qPCR	athGRF4_Fw	AT3G52910	CCGGTAACAACACGTCCTCA	59.4
qPCR	athGRF4_Rev	AT3G52910	TGACGTCGAAGAAGCTGACC	59.4
qPCR	athGRF7_Fw	AT5G53660	CCGATGTCTACCACACCTGG	61.4
qPCR	athGRF7_Rev	AT5G53660	TCACTCTAGACGGGGACGAG	61.4
qPCR	athGRF8_Fw	AT4G24150	GCTGCTGTGACTGTAGCAGA	59.4
qPCR	athGRF8_Rev	AT4G24150	CTCATGCCATTGAGCTTCGC	59.4
qPCR	athGRF9_Fw	AT2G42590	AGGAAGGTGCCGAAGAACAG	59.4
qPCR	athGRF9_Rev	AT2G42590	ATCAGAAACTCGGGGCAGTG	59.4

Annexe 4 : Paramètres et versions utilisés pour l'analyse d'expression pour les échantillons du séquençage haut-débit des ARNm

- R version 3.5.1 (2018-07-02), x86_64-redhat-linux-gnu
- Locale: LC_CTYPE=en_US.UTF-8, LC_NUMERIC=C, LC_TIME=en_US.UTF-8, LC_COLLATE=en_US.UTF-8, LC_MONETARY=en_US.UTF-8, LC_MESSAGES=en_US.UTF-8, LC_PAPER=en_US.UTF-8, LC_NAME=C, LC_ADDRESS=C, LC_TELEPHONE=C, LC_MEASUREMENT=en_US.UTF-8, LC_IDENTIFICATION=C
- Running under: CentOS Linux 7 (Core)
- Matrix products: default
- BLAS/LAPACK: /usr/lib64/R/lib/libRblas.so
- Base packages: base, datasets, graphics, grDevices, methods, parallel, stats, stats4, utils
- Other packages: Biobase 2.42.0, BiocGenerics 0.28.0, BiocParallel 1.16.6, DelayedArray 0.8.0, DESeq2 1.22.2, devtools 2.2.1, edgeR 3.24.3, GenomeInfoDb 1.18.2, GenomicRanges 1.34.0, ggplot2 3.2.1, IRanges 2.16.0, kableExtra 1.1.0, limma 3.38.3, matrixStats 0.55.0, S4Vectors 0.20.1, SARTools 1.7.3, SummarizedExperiment 1.12.0, usethis 1.5.1
- Loaded via a namespace (and not attached): acepack 1.4.1, annotate 1.60.1, AnnotationDbi 1.44.0, assertthat 0.2.1, backports 1.1.5, base64enc 0.1-3, bit 1.1-15.1, bit64 0.9-7, bitops 1.0-6, blob 1.2.1, callr 3.4.1, checkmate 1.9.4, cli 2.0.1, cluster 2.0.7-1, colorspace 1.4-1, compiler 3.5.1, crayon 1.3.4, data.table 1.12.8, DBI 1.1.0, desc 1.2.0, digest 0.6.23, dplyr 0.8.4, ellipsis 0.3.0, evaluate 0.14, fansi 0.4.1, farver 2.0.3, foreign 0.8-70, Formula 1.2-3, fs 1.3.1, genefilter 1.64.0, geneplotter 1.60.0, GenomeInfoDbData 1.2.0, GGally 1.4.0, ggdendro 0.1-20, ggrepel 0.8.1, glue 1.3.1, grid 3.5.1, gridExtra 2.3, gtable 0.3.0, highr 0.8, Hmisc 4.3-0, hms 0.5.3, htmlTable 1.13.3, htmltools 0.4.0, htmlwidgets 1.5.1, httr 1.4.1, knitr 1.27, labeling 0.3, lattice 0.20-35, latticeExtra 0.6-28, lazyeval 0.2.2, lifecycle 0.1.0, locfit 1.5-9.1, magrittr 1.5, MASS 7.3-50, Matrix 1.2-14, memoise 1.1.0, munsell 0.5.0, nnet 7.3-12, pillar 1.4.3, pkgbuild 1.0.6, pkgconfig 2.0.3, pkgload 1.0.2, plyr 1.8.5, prettyunits 1.1.1, processx 3.4.1, ps 1.3.0, purrr 0.3.3, R6 2.4.1, RColorBrewer 1.1-2, Rcpp 1.0.3, RCurl 1.98-1.1, readr 1.3.1, remotes 2.1.0, reshape 0.8.8, rlang 0.4.4, rmarkdown 2.1, rpart 4.1-13, rprojroot 1.3-2, RSQLite 2.2.0, rstudioapi 0.10, rvest 0.3.5, scales 1.1.0, sessioninfo 1.1.1, splines 3.5.1, stringi 1.4.5, stringr 1.4.0, survival 2.42-3, testthat 2.2.1, tibble 2.1.3, tidyselect 1.0.0, tools 3.5.1, vctrs 0.2.2, viridisLite 0.3.0, webshot 0.5.2, withr 2.1.2, xfun 0.12, XML 3.99-0.3, xml2 1.2.2, xtable 1.8-4, XVector 0.22.0, yaml 2.2.1, zlibbioc 1.26.0
  Parameter values used for this analysis are:

- workDir: .
- projectName: featuretype_gene1
- author: Julie
- targetFile: fichier.txt
- rawDir: raw
- featuresToRemove: NULL
- varInt: condition
- condRef: t0
- batch: NULL
- fitType: parametric
- cooksCutoff: TRUE
- independentFiltering: TRUE
- alpha: 0.05
- pAdjustMethod: BH
- typeTrans: VST
- locfunc: median
- colors: #f3c300, #875692, #f38400, #a1caf1, #be0032, #c2b280, #848482, #008856, #e68fac, #0067a5, #f99379, #604e97

Annexe 5 : Paramètres et versions utilisés pour l'analyse d'expression pour les échantillons du séquençage haut-débit des petits ARNs

- R version 3.5.1 (2018-07-02), x86_64-redhat-linux-gnu
- Locale: LC_CTYPE=en_US.UTF-8, LC_NUMERIC=C, LC_TIME=en_US.UTF-8, LC_COLLATE=en_US.UTF-8, LC_MONETARY=en_US.UTF-8, LC_MESSAGES=en_US.UTF-8, LC_PAPER=en_US.UTF-8, LC_NAME=C, LC_ADDRESS=C, LC_TELEPHONE=C, LC_MEASUREMENT=en_US.UTF-8, LC_IDENTIFICATION=C
- Running under: CentOS Linux 7 (Core)
- Matrix products: default
- BLAS/LAPACK: /usr/lib64/R/lib/libRblas.so
- Base packages: base, datasets, graphics, grDevices, methods, parallel, stats, stats4, utils
- Other packages: AnnotationDbi 1.44.0, Biobase 2.40.0, BiocGenerics 0.26.0, BiocParallel 1.16.6, clusterProfiler 3.10.1, DelayedArray 0.6.6, DESeq2 1.20.0, DOSE 3.8.2, edgeR 3.24.3, enrichplot 1.2.0, GenomeInfoDb 1.16.0, GenomicRanges 1.34.0, ggplot2 3.2.1, IRanges 2.16.0, kableExtra 1.0.1, limma 3.38.3, matrixStats 0.55.0, MOFA 1.3.1, MOFAdata 0.99.4, org.At.tair.db 3.7.0, org.Hs.eg.db 3.7.0, pathview 1.22.3, S4Vectors 0.20.1, SARTools 1.7.1, SummarizedExperiment 1.10.1
- Loaded via a namespace (and not attached): acepack 1.4.1, annotate 1.58.0, assertthat 0.2.1, backports 1.1.5, base64enc 0.1-3, beeswarm 0.2.3, Biostrings 2.50.2, bit 1.1-14, bit64 0.9-7, bitops 1.0-6, blob 1.1.1, checkmate 1.9.1, cluster 2.0.7-1, codetools 0.2-15, colorspace 1.4-1, compiler 3.5.1, corrplot 0.84, cowplot 1.0.0, crayon 1.3.4, data.table 1.12.6, DBI 1.0.0, digest 0.6.22, DO.db 2.9, doParallel 1.0.15, dplyr 0.8.3, europepmc 0.3, evaluate 0.12, farver 1.1.0, fastmatch 1.1-0, fgsea 1.8.0, foreach 1.4.7, foreign 0.8-70, Formula 1.2-3, genefilter 1.62.0, geneplotter 1.58.0, GenomeInfoDbData 1.1.0, GGally 1.4.0, ggbeeswarm 0.6.0, ggdendro 0.1-20, ggforce 0.3.1, ggplotify 0.0.4, ggraph 2.0.0, ggrepel 0.8.1, ggridges 0.5.1, glue 1.3.1, GO.db 3.7.0, GOSemSim 2.8.0, graph 1.60.0, graphlayouts 0.5.0, grid 3.5.1, gridExtra 2.3, gridGraphics 0.4-1, gtable 0.3.0, hexbin 1.27.3, highr 0.7, Hmisc 4.2-0, hms 0.5.2, htmlTable 1.13.1, htmltools 0.4.0, htmlwidgets 1.5.1, httr 1.4.1, igraph 1.2.2, iterators 1.0.12, jsonlite 1.6, KEGGgraph 1.42.0, KEGGREST 1.22.0, knitr 1.21, labeling 0.3, lattice 0.20-35, latticeExtra 0.6-28, lazyeval 0.2.2, lifecycle 0.1.0, locfit 1.5-9.1, magrittr 1.5, MASS 7.3-50, Matrix 1.2-14, memoise 1.1.0, MultiAssayExperiment 1.6.0, munsell 0.5.0, nnet 7.3-12, pheatmap 1.0.12, pillar 1.4.2, pkgconfig 2.0.3, plyr 1.8.4, png 0.1-7, polyclip 1.10-0, prettyunits 1.0.2, progress 1.2.2, purrr 0.3.3, qvalue 2.14.1, R6 2.4.0, RColorBrewer 1.1-2, Rcpp 1.0.2, RCurl 1.95-4.12, readr 1.3.1, reshape 0.8.8, reshape2 1.4.3, reticulate 1.13, Rgraphviz 2.26.0, rhdf5 2.24.0, Rhdf5lib 1.2.1, rlang 0.4.1, rmarkdown 1.11, rpart 4.1-13, RSQLite 2.1.1, rstudioapi 0.9.0, rvcheck 0.1.3, rvest 0.3.2, scales 1.0.0, splines 3.5.1, stringi 1.4.3, stringr 1.4.0, survival 2.42-3, tibble 2.1.3, tidygraph 1.1.2, tidyr 1.0.0, tidyselect 0.2.5, tools 3.5.1, triebeard 0.3.0, tweenr 1.0.1, UpSetR 1.4.0, urltools 1.7.3, vctrs 0.2.0, vipor 0.4.5, viridis 0.5.1, viridisLite 0.3.0, webshot 0.5.1, withr 2.1.2, xfun 0.4, XML 3.98-1.20, xml2 1.2.0, xtable 1.8-4, XVector 0.22.0, yaml 2.2.0, zeallot 0.1.0, zlibbioc 1.26.0

Parameter values used for this analysis are:

- workDir: .
- projectName: mirfinal
- author: Julie
- targetFile: fichier_propre.txt
- rawDir: raw
- featuresToRemove: intergenicintergenic, exonexon, intronintron, not_aligned, too_low_aQual
- varInt: condition
- condRef: t0
- batch: replicat
- fitType: parametric
- cooksCutoff: TRUE
- independentFiltering: TRUE
- alpha: 0.1
- pAdjustMethod: BH
- typeTrans: VST
- locfunc: median
- colors: dodgerblue, firebrick1, MediumVioletRed, SpringGreen

Annexe 6 : Listes des miARNs matures conservés identifiés dans le séquençage.

>miR156z
ATTGGAGTGAAGGGAGCT
>miR172g-3p
GGAATCTTGATGATGCTGCAG
>miR172b
GGAATCTTGATGATGCTGCA
>miR166d-5p_2
GGAATGTTGTCTGGCTCGAGG
>miR166a
TCGGACCAGGCTTCATTCC
>miR172j
GCAGCATCATCAAGATTCCCA
>miR166e
GGACCAGGCTTCATTCCCC
>miR166e-3p
CTCGGACCAGGCTTCATTCCC
>miR172d_2
TGAGAATCTTGATGATGCTGCAT
>miR160h
TGCCTGGCTCCCTGTATGCCATT
>miR393b-5p
TCCAAAGGGATCGCATTGATCT
>miR159b-3p_1
ATTGGAGTGAAGGGAGCTCCA
>miR393a-3p_2
ATCATGCTATCCCTTTGGATT
>miR171l
CGAGCCGAACCAATATCACTC
>miR171c-5p_2
AGATATTGGTGCGGTTCAATC
>miR393-5p
TTCCAAAGGGATCGCATTGAT
>miR319c_1
TTGGACTGAAGGGAGCTCCT
>miR319_1
TTGGACTGAAGGGAGCTCC
>miR393a
TCCAAAGGGATCGCATTGATC
>miR393a-5p
TCCAAAGGGATCGCATTGATCC
>miR172a_2
AGAATCTTGATGATGCTGCA
>miR171b-3p
TTGAGCCGTGCCAATATCAC
>miR172i
AGAATCCTGATGATGCTGCAA
>miR393a_1
ATCCAAAGGGATCGCATTGATC
>miR393h
TTCCAAAGGGATCGCATTGATC
>miR393a_3
CATCCAAAGGGATCGCATTGA
>miR319b_1
CTTGGACTGAAGGGAGCTCCT
>miR171a-3p
TGATTGAGCCGCGCCAATATC
>miR166h-3p_1
TCTCGGACCAGGCTTCATTCC
>miR166e-5p
GGAATGTTGTCTGGCACGAGG
>miR160a-3p_2
GCGTATGAGGAGCCATGCATA
>miR160a-5p_1
GCCTGGCTCCCTGTATGCCAT
>miR172c-5p_3
AGCATCTTCAAGATTCACA
>miR828a_1
TCTTGCTCAAATGAGTATTCCA
>miR171a_3
TGATTGAGCCGTGCCAATAT
>miR169g
TAGCCAAGGATGACTTGCCTGC
>miR166g-5p_3
GAATGCTGTCTGGTTCGAGAC
>miR8175
GATCCCCGGCAACGGCGCCA
>miR166u
TCTCGGACCAGGCTTCATTC
>miR164b
TGGAGAAGCAGGGCACGTGC
>miR166
TCGGACCAGGCTTCATTCCCCC
>miR8051-5p
TAGTATGGTAGAAAGATTCA
>miR164f_1
TGGAGAAGCAGGGCACATGCT
>miR160g_2
TGCCTGGCTCCCTGGATGCCA
>miR408b_1
TGCACTGCCTCTTCCCTGGCT
>miR408d
TGCACTGCCTCTTCCCTGGC
>miR3711
TGGCGCTAGAAGGAGGGCCT
>miR530_2
TCTGCATTTGCACCTGCACCT
>miR156f
TTGACAGAAGAGAGAGAGCACA
>miR390a-5p
AAGCTCAGGAGGGATAGCGCC
>miR319f_1
ATTGGACTGAAGGGAGCTCC
>miR530a_2
TGCATTTGCACCTGCACCTC
>miR408-3p_2
ATGCACTGCCTCTTCCCTGGC
>miR396g-3p
GTTCAAGAAAGCTGTGGAAGA
>miR396g
TCCACAGGCTTTCTTGAACGG
>miR171b_3
TGATTGAGCCGCGTCAATATC
>miR827a
TTAGATGACCATCAACAAACA
>miR166h-5p
GGAATGTTGGCTGGCTCGAGG
>miR845
TGCTCTGATACCAATTGTTGG
>miR396h
TCCACAGCTTTCTTGAACTG
>miR396a-5p
TTCCACAGCTTTCTTGAACTG
>miR171_2
TTGAGCCGCGTCAATATCTCC

>miR171c_3
AGATTGAGCCGCGCCAATATC
>miR169v_1
CAGCCAAGGATGACTTGCC
>miR169b-5p
CAGCCAAGGATGACTTGCCGG
>miR171d_1
TTGAGCCGCGCCAATATCAC
>miR171f_3
TTGAGCCGCGCCAATATCACT
>miR171b-3p_3
TTGAGCCGTGCCAATATCACG
>miR396a-3p_4
GTTCAATAAAGCTGTGGGAA
>miR171e-5p
CGATGTTGGTGAGGTTCAATC
>miR3627d
TCCATCCTCCTGTGACATGAA
>miR6281
GTTAGAGATAGAGAGAGTGAG
>miR171e_1
TTATTGAACCGGACCAATATC
>miR319g
TTGGACTGAAGGGAGCTCCCA
>miR396a-3p_1
GTTCAATAAAGCTGTGGGAAG
>miR396a-3p_5
TTCAATAAAGCTGTGGGAAG
>miR169e_3
AGCCAAGGATGACTTGCCGG
>miR171f-5p_2
GGATATTGGTCCGGTTCAATA
>miR319p
TTTTGGACTGAAGGGAGCTCC
>miR396b-5p
TTCCACAGCTTTCTTGAACTT
>miR2109
TGCGAGTGTCTTCGCCTCTGA
>miR156c_1
TGACAGAAGAGAGGGAGCA
>miR156k_1
TGACAGAAGAGAGGGAGCAC
>miR169d-5p_1
TAGCCAAGGATGACTTGCCT
>miR390.1
TAAAGCTCAGGAGGGATAGCG
>miR164a_2
TGGAGAAGCAGGGCACTTGCT
>miR2111a-5p
TAATCTGCATCCTGAGGTTTA
>miR172a_3
AGAATCTTGATGATGCTGCAT
>miR172c-3p
AGAATCTTGATGATGCTGC
>miR171b
TGAGCCGTGCCAATATCACAT
>miR172e-3p
GGAATCTTGATGATGCTGCAT
>miR399e_5
TGCCAAAGGAGATTTGCTCGG
>miR398b_3
CGTGTTCTCAGGTCGCCCCTG
>miR160a-5p
TGCCTGGCTCCCTGTATGCCA
>miR160b_1
TGCCTGGCTCCCTGTATGCC
>miR160
TGGCATACAGGGAGCCAGGCA
>miR167d
TGAAGCTGCCAGCATGATCTGG
>miR167d-5p
TGAAGCTGCCAGCATGATCTG
>miR2275a-3p_2
TTTAGTTTCCTCCAATATCTTA
>miR397a_6
ATTGAGTGCAGCGTTGATGAA
>miR397-5p_1
ATTGAGTGCAGCGTTGATGA
>miR172c-5p
GTAGCATCATCAAGATTCACA
>miR172b-5p_2
GTAGCATCATCAAGATTCAC
>miR398b
TGTGTTCTCAGGTCGCCCCTG
>miR2275-3p
TTTGGTTTCCTCCAATATCTCG
>miR399f_3
TGCCAAAGGAGATTTGCCCGG
>miR399a_5
TGCCAAAGGAGAATTACCCTG
>miR2109-5p
TGCGAGTGTCTTCGCCTCTG
>miR319b-5p_2
GAGCTTTCTTCAGTCCACTC
>miR319a-3p
TTGGACTGAAGGGAGCTCCC
>miR319a
CTTGGACTGAAGGGAGCTCC
>miR319c_2
CTTGGACTGAAGGGAGCTCCC
>miR169u
CAGCCAAGGATGACTTGCCGT
>miR1030a
TCTGCATCTGCACCTGCACCA
>miR172e-3p_1
GAATCTTGATGATGCTGCAT
>miR390e
AGCTCAGGAGGGATAGCGCC
>miR156j_1
GTTGACAGAAGAGAGTGAGCAC
>miR169h_2
TAGCCAAGGATGACTTGCCTG
>miR399e
TGCCAAAGGAGATTTGCCCAG
>miR7125
CGAACTTATTGCAACTAGCTT
>miR172d-5p_5
GCGGCATCATCAAGATTCACA
>miR160b-3p
GCGTACGAGGAGCCAAGCATA
>miR172f
TGAATCTTGATGATGCCGCAC
>miR159c
TTTGGTTTGAAGGGGGCTCTG
>miR172a_1
GGGAATCTTGATGATGCTGCA
>miR397a_3
TCATTGAGTGCAGCGTTGATG
>miR399a_6
TGCCAAAGGAGAATTGCCCTG
>miR399_1
TGCCAAAGGAGAATTGCCC
>miR172a_4
AGAATCCTGATGATGCTGCAG
>miR395b-3p
AAGTGTTTGGGGGAACTC
>miR4995
AGGCAGTGGCTTGGTTAAGGG

>miR395l
CTGAAGTGTTTGGGGGAACCC
>miR398
TGTGTTCTCAGGTCACCCCT
>miR398a-3p_1
TGTGTTCTCAGGTCACCCCTT
>miR403-3p_1
TTAGATTCACGCACAAACTCG
>miR395d-5p_1
GTTCCCTTGACCACTTCATTG
>miR395a_5
CTGAAGTGTTTGGGGGAACTC
>miR169k_3
TGAGCCAAGGATGACTTGCCT
>miR395b_3
TGAAGTGTTTGGGGGAACTC
>miR395a_1
CTGAAGTGTTTGGGGGAACTCC
>miR156c
TTGACAGAAGAGAGAGAGCAC
>miR398b-3p_1
TTGTGTTCTCAGGTCACCCCT
>miR4414a-5p
AGCTGCTGACTCGTTGGTTCA
>miR167c_1
TGAAGCTGCCAGCATGATCTC
>miR169j-3p_1
GGCAGTCTCCTTGGCTATC
>miR395a-3p
CTGAAGTGTTTGGGGGGACCC
>miR156_2
TTGACAGAAGATAGAGAGC
>miR166a-3p
TCGGACCAGGCTTCATTCCCC
>miR5139
AAACCTGGCTCTGATACCA
>miR319a_1
TTGGACTGAAGGGAGCTCCCT
>miR168a-3p
CCCGCCTTGCATCAACTGAAT
>miR162a-5p_1
GGAGGCAGCGGTTCATCGATC
>miR162a-5p
TGGAGGCAGCGGTTCATCGATC
>miR399b
TGCCAAAGGAGAGTTGCCCTG
>miR5138
AAAAATCGTTAGGCGCTA
>miR157d-3p
GCTCTCTATGCTTCTGTCATC
>miR6300
GTCGTTGTAGTATAGTGG
>miR171f-3p
TTGAGCCGTGCCAATATCACA
>miR169f.1
TAGCCAAGGATGACTTGCCTA
>miR168-3p
TCCCGCCTTGCATCAACTGAAT
>miR162a-3p
TCGATAAACCTCTGCATCCAG
>miR162-3p
TCGATAAACCTCTGCATCCA
>miR166m_2
CGGACCAGGCTTCATTCCCC
>miR845b-3p
TCGCTCTGATACCAAATGATG
>miR168a-5p
TCGCTTGGTGCAGGTCGGGAA
>miR168
TCGCTTGGTGCAGGTCGGGA
>miR168-5p
TCGCTTGGTGCAGGTCGGGAAC
>miR157a-5p
TTGACAGAAGATAGAGAGCAC
>miR157d
TGACAGAAGATAGAGAGCAC
>miR171a-3p_1
TGATTGAGCCGCGCCAATAT
>miR156g_1
ACAGAAGATAGAGAGCACAG
>miR156d-3p_4
GCTCTCTATGCTTCTGTCATCA
>miR159a_1
TTTGGATTGAAGGGAGCTCTA
>miR160h_1
TGCCTGGCTCCCTGCATGCCA
>miR477e
CTCTCCCTCAAGGGCTTCTA
>miR394a_1
TTGGCATTCTGTCCACCTCC
>miR167a
TGAAGCTGCCAGCATGATCTAA
>miR167d_1
TGAAGCTGCCAGCATGATCT
>miR171b_2
TGATTGAGCCGTGCCAATATC
>miR166h-3p
TCGGACCAGGCTTCATTCCC
>miR8626
GTCAGCAGCCGCCGCCGC
>miR164a_1
CACGTGCTCCCCTTCTCCAAC
>miR166-3p
ATTTCGGACCAGGCTTCATTCCCC
>miR167a-5p
TGAAGCTGCCAGCATGATCTA
>miR156f-3p_4
GCTCACTCTCTATCTGTCACC
>miR167b-3p_3
GGTCATGCTCTGACAGCCTCACT
>miR171c-5p
TATTGGTGCGGTTCAATCAGA
>miR156b-3p
TGCTCACTCTCTATCTGTCACC
>miR1510b-3p
TGTTGTTTTACCTATTCCACC
>miR396b
TTCCACAGCTTTCTTGAACT
>miR396e
TTCCACAGCTTTCTTGAACTGT
>miR156a-5p
TGACAGAAGAGAGTGAGCAC
>miR156a
TGACAGAAGAGAGTGAGCACA
>miR164a_4
TGGAGAAGCAGGGCACGTGCA
>miR164_1
TGGAGAAGGGGAGCACGTGCA
>miR3623-5p
TCACAAGTTCATCCAAGCACCA
>miR164e-5p
TGGAGAAGCAGGGCACGTGCAA
>miR156k_2
TTGACAGAAGAGAGTGAGCAC

Annexe 7 : Recherche de gènes cibles homologues sur le génome de *Rosa chinensis*

Tableau X : **Recherche de gènes cibles homologues sur le génome de *Rosa chinensis* par analyse PsRNA Target des miARNs *Rosa* 'Radrazz' différentiellement exprimés dans le séquençage des petits ARNs.** Les numéros d'accession correspondant des homologues *Rosa chinensis* et *Arabidopsis thaliana* sont indiqués.

Nom du miARN	Numéro d'accession du gène ciblé	Numéro d'accession des orthologues chez *Arabidopsis*	Nom du gène ciblé	Également ciblé par le miARN
miR160	RC1G0030500	AT3G08030	Protein of unknown function	
	RC1G0176700	AT2G27110	FAR1-related sequence 3	
	RC2G0528200	AT3G06240	F-box family protein	
	RC3G0254500	-	Nucleoporin autopeptidase	
	RC6G0259000	AT5G09330	NAC domain containing protein 82	
	RC6G0350000	AT5G48830	Protein of unknown function	
	RC7G0173000	AT5G41760	Nucleotide-sugar transporter family protein	
	RC7G0246300	AT5G47470	WAT1-related protein At5g47470	
	RC7G0357800	AT4G38180	FAR1-related sequence 5	
	RC7G0455100	AT4G00350	MATE efflux family protein	
miR162a-3p	RC1G0376200	-	-	
	RC1G0395300	AT1G01040	DCL1	
	RC1G0403800	AT5G04290	kow domain-containing transcription factor 1 (KTF1)	
	RC1G0555600	-	WD-40 repeat family protein / notchless protein	
	RC2G0186600	-	Protein of unknown function	
	RC2G0300600	AT5G64030	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	

miR162a-3p	RC2G0503400	AT1G50430	Ergosterol biosynthesis ERG4/ERG24 family	
	RC3G0185300	AT3G11560	LETM1-like protein	
	RC3G0341900	AT1G56230	Protein of unknown function (DUF1399)	
	RC3G0371600	AT5G27220	Frigida-like protein	
	RC4G0239200	AT3G14470	NB-ARC domain-containing disease resistance protein	
	RC4G0391100	-	Protein of unknown function	
	RC5G0045400	AT4G21350	plant U-box 8	
	RC7G0390000	AT4G24280	chloroplast heat shock protein 70-2	
miR166u	RC0G0290700	AT3G13080	multidrug resistance-associated protein 3	
	RC1G0492900	AT3G56330	N2	
	RC2G0174500	AT1G49475	AP2/B3-like transcriptional factor family protein	
	RC2G0477300	AT1G52150	Homeobox-leucine zipper family protein / lipid-binding START domain-containing protein (CORONA)	
	RC2G0493800	-	?	
	RC4G0141900	AT2G18900	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	
	RC5G0079100	AT1G28240	Protein of unknown function (DUF616)	
	RC5G0148400	AT2G34710	HD-ZIPIII (PHABULOSA)	
	RC5G0375400	AT6G44530	homolog of histone chaperone HIRA	
	RC5G0398400	AT3G13080	multidrug resistance-associated protein 3	
	RC5G0419000	AT3G44200	NIMA (never in mitosis)	
	RC5G0507100	AT5G60690	HD-ZIPIII (REVOLUTA)	
	RC6G0116100	AT4G25000	alpha-amylase-like	
	RC6G0363600	AT1G04110	Subtilase family protein	
	RC6G0398400	AT3G63290	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	

miR166u	RC6G0415500	AT2G48030	DNAse I-like superfamily protein	
	RC7G0008200	AT3G17740	Protein of unknown function	
	RC7G0319000	AT3G44200	NIMA (never in mitosis)	
	RC7G0537200	-	?	
miR319a_1	RC1G0131600	AT5G06100	MYB33	319b_1
	RC1G0264500	AT3G60460	myb-like HTH transcriptional regulator family protein	
	RC1G0384100	AT1G72000	probable alkaline/neutral invertase F	
	RC1G0509100	AT3G47450	NITRIC OXIDE SYNTHASE 1	
	RC1G0539000	AT4G25540	homolog of DNA mismatch repair protein MSH3	
	RC2G0087200	AT5G57030	Lycopene beta/epsilon cyclase protein	
	RC2G0270200	AT4G39840	Protein of unknown function	319b_1
	RC2G0542000	AT2G32460	myb domain protein 101	
	RC2G0670100	-	F-box protein SKIP14	319b_1
	RC3G0302000	AT5G03570	iron regulated 2	319b_1
	RC3G0302300	AT5G03570	iron regulated 2	319b_1
	RC5G0134300	AT4G18390	TCP2	319b_1
	RC5G0279600	AT3G15030	TCP4	
	RC6G0050900	AT5G03570	iron regulated 2	319b_1
	RC6G0519900	AT4G35070	SBP (S-ribonuclease binding protein) family protein	
	RC7G0284200	AT1G67070	Mannose-6-phosphate isomerase	319b_1
	RC7G0529900	AT4G02330	pectinesterase/pectinesterase inhibitor 41	319b_1
	RC7G0571800	AT2G16760	Calcium-dependent phosphotriesterase superfamily protein	
miR319b_1	RC0G0224600	-	?	

miR319b_1	RC1G0306300	AT2G45510	cytochrome P450	
	RC2G0205100	AT4G37380	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	
	RC2G0521000	-	Protein of unknown function	
	RC2G0567700	AT2G20830	transferases	
	RC2G0586200	AT3G02350	galacturonosyltransferase 9	
	RC2G0590400	AT3G51550	Malectin/receptor-like protein kinase family protein	
	RC5G0664500	AT5G12950	Putative glycosyl hydrolase of unknown function (DUF1680)	
	RC6G0318800	-	?	
	RC6G0440500	AT2G19770	profilin 5	
	RC7G0209800	AT2G42010	phospholipase D beta 1	
miR396a-5p/miR396b	RC0G0038800	AT4G29990	Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase protein	
	RC0G0040300	AT4G29990	Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase protein	
	RC0G0046300	AT1G51940	protein kinase family protein / peptidoglycan-binding LysM domain-containing protein	
	RC0G0131600	AT3G13960	GRF5B	
	RC1G0062200	-	Armadillo/beta-catenin-like repeat family protein	
	RC1G0248400	-	?	
	RC1G0281800	AT1G31650	RHO guanyl-nucleotide exchange factor 14	
	RC1G0304400	AT2G45480	GRF9	
	RC1G0341400	AT4G18950	Integrin-linked protein kinase family	
	RC1G0392500	AT4G00800	transducin family protein / WD-40 repeat family protein	
	RC1G0441400	AT3G12590	Protein of unknown function	
	RC1G0514100	AT5G51430	conserved oligomeric Golgi complex component-related / COG complex component-related	

miR396a-5p/miR396b	RC1G0530500	AT2G45650	AGAMOUS-like 6	
	RC1G0542700	AT5G52400	cytochrome P450	
	RC1G0584300	AT5G53660	GRF7	
	RC1G0598900	AT3G13960	GRF5A	
	RC2G0010800	AT3G12580	heat shock protein 70B	
	RC2G0051700	AT3G14940	phosphoenolpyruvate carboxylase 3	
	RC2G0093200	AT3G14690	cytochrome P450	
	RC2G0093600	AT2G06200	GRF6	
	RC2G0096600	AT3G62130	L-CYSTEINE DESULFHYDRASE	
	RC2G0199100	AT1G47128	Granulin repeat cysteine protease family protein	
	RC2G0208700	AT4G24230	acyl-CoA-binding domain 3	
	RC2G0220500	AT2G22840	GRF1A	
	RC2G0251400	-	Protein of unknown function	
	RC2G0362600	AT3G06350	dehydroquinate dehydratase	
	RC2G0363300	AT3G06350	dehydroquinate dehydratase	
	RC2G0385300	AT1G53310	phosphoenolpyruvate carboxylase 1	
	RC2G0499000	AT4G31480	Coatomer	
	RC2G0499400	AT4G31480	Coatomer	
	RC2G0545700	AT1G05190	Ribosomal protein L6 family (RPL6)	
	RC2G0616300	AT5G15280	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein	
	RC2G0616700	AT5G15280	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein	
	RC2G0689500	AT3G26780	Phosphoglycerate mutase family protein	
	RC3G0051700	AT1G66260	ALWAYS EARLY 4	

miR396a-5p/miR396b	RC3G0064400	-	?	
	RC3G0073200	-	Protein of unknown function	
	RC3G0087500	AT2G31400	genomes uncoupled 1	
	RC3G0111300	AT1G31650	RHO guanyl-nucleotide exchange factor 14	
	RC3G0130000	AT3G57600	Integrase-type DNA-binding superfamily protein	
	RC3G0196800	AT2G36230	Aldolase-type TIM barrel family protein	
	RC3G0236600	AT2G36400	GRF3	
	RC3G0241700	AT3G09650	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	
	RC3G0243400	AT2G20280	Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type family protein	
	RC3G0260300	AT5G02250	Ribonuclease II/R family protein	
	RC3G0324800	AT5G26600	Probable L-cysteine desulfhydrase	
	RC3G0404600	AT1G64790	ILITYHIA	
	RC3G0408700	AT2G02230	phloem protein 2-B1	
	RC4G0130300	AT1G17890	Putative GDP-L-fucose synthase 2	
	RC4G0233800	AT3G06010	Homeotic gene regulator	
	RC4G0305600	AT5G26600	L-cysteine desulfhydrase	
	RC4G0348200	AT1G67360	Rubber elongation factor protein (REF)	
	RC4G0449700	AT1G70890	MLP-like protein 43	
	RC4G0468300	AT5G14740	carbonic anhydrase 2	
	RC5G0044800	AT1G61680	terpene synthase 14	
	RC5G0093000	AT1G53210	sodium/calcium exchanger family protein / calcium-binding EF hand family protein	
	RC5G0210200	AT5G26600	Pyridoxal phosphate (PLP)-dependent transferases superfamily protein	
	RC5G0322500	AT3G62130	L-cysteine desulfhydrase	

miR396a-5p/miR396b	RC5G0322600	AT3G62130	L-cysteine desulfhydrase	
	RC5G0528200	AT2G12550	ubiquitin-associated (UBA)/TS-N domain-containing protein	
	RC5G0556000	AT4G12010	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family	
	RC5G0575600	AT5G59030	copper transporter 1	
	RC5G0680800	-	Uncharacterized protein	
	RC5G0711300	AT2G44430	DNA-binding bromodomain-containing protein	
	RC6G0006000	AT5G17680	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)	
	RC6G0009300	AT1G71350	eukaryotic translation initiation factor SUI1 family protein	
	RC6G0138400	-	long-chain acyl-CoA synthetase 2	
	RC6G0220400	-	?	
	RC6G0391700	AT5G14050	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	
	RC6G0581400	AT2G22840	GRF1B	
	RC6G0600300	AT3G43920	DCL3	
	RC6G0606900	AT4G32590	2Fe-2S ferredoxin-like superfamily protein	
	RC7G0058600	AT5G61140	U5 small nuclear ribonucleoprotein helicase	
	RC7G0098100	AT4G24150	GRF8	
	RC7G0113400	-	?	
	RC7G0114600	AT3G48770	DNA binding	
	RC7G0115100	AT3G48770	DNA binding	
	RC7G0151500	AT5G03560	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	
	RC7G0175100	AT3G59140	multidrug resistance-associated protein 14	
	RC7G0327700	AT4G37740	GRF2	
	RC7G0339100	AT1G31650	RHO guanyl-nucleotide exchange factor 14	

miR396a-5p/miR396b	RC7G0424700	AT5G64840	general control non-repressible 5	
	RC7G0430600	AT2G15630	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein	
	RC7G0487300	-	Plant transposase (Ptta/En/Spm family)	
	RC7G0490000	-	?	
	RC6G0267900	AT2G31290	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase family protein	
	RC7G0174900	AT3G59140	multidrug resistance-associated protein 14	

Annexe 8 : Valorisation scientifique

frontiers in Plant Science

HYPOTHESIS AND THEORY
published: 31 January 2022
doi: 10.3389/fpls.2021.770363

Photocontrol of Axillary Bud Outgrowth by MicroRNAs: Current State-of-the-Art and Novel Perspectives Gained From the Rosebush Model

*Julie Mallet[1], Patrick Laufs[2], Nathalie Leduc[1] and José Le Gourrierec[1]**

[1] University of Angers, Institut Agro, INRAE, IRHS, SFR QUASAV, Angers, France, [2] Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB), Versailles, France

OPEN ACCESS

Edited by:
Turgay Unver, FicusBio, Turkey

Reviewed by:
Marcelo Carnier Dornelas, State University of Campinas, Brazil
Lili Zhuang, Nanjing Agricultural University, China
Munevver Dogramaci, Edward T. Schafer Agricultural Research Center, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service (USDA-ARS), United States

***Correspondence:**
José Le Gourrierec
jose.gentilhomme@univ-angers.fr

Specialty section:
This article was submitted to Plant Physiology, a section of the journal Frontiers in Plant Science

Received: *03 September 2021*
Accepted: *13 December 2021*
Published: *31 January 2022*

Citation:
Mallet J, Laufs P, Leduc N and Le Gourrierec J (2022) Photocontrol of Axillary Bud Outgrowth by MicroRNAs: Current State-of-the-Art and Novel Perspectives Gained From the Rosebush Model. Front. Plant Sci. 12:770363. doi: 10.3389/fpls.2021.770363

Shoot branching is highly dependent on environmental factors. While many species show some light dependence for branching, the rosebush shows a strict requirement for light to allow branching, making this species an excellent model to further understand how light impinges on branching. Here, in the first part, we provide a review of the current understanding of how light may modulate the complex regulatory network of endogenous factors like hormones (SL, IAA, CK, GA, and ABA), nutrients (sugar and nitrogen), and ROS to control branching. We review the regulatory contribution of microRNAs (miRNAs) to branching in different species, highlighting the action of such evolutionarily conserved factors. We underline some possible pathways by which light may modulate miRNA-dependent regulation of branching. In the second part, we exploit the strict light dependence of rosebush for branching to identify putative miRNAs that could contribute to the photocontrol of branching. For this, we first performed a profiling of the miRNAs expressed in early light-induced rosebush buds and next tested whether they were predicted to target recognized regulators of branching. Thus, we identified seven miRNAs (miR156, miR159, miR164, miR166, miR399, miR477, and miR8175) that could target nine genes (*CKX1/6*, *EXPA3*, *MAX4*, *CYCD3;1*, *SUSY*, *6PFK*, *APX1*, and *RBOHB1*). Because these genes are affecting branching through different hormonal or metabolic pathways and because expression of some of these genes is photoregulated, our bioinformatic analysis suggests that miRNAs may trigger a rearrangement of the regulatory network to modulate branching in response to light environment.

Keywords: branching, light control, lateral meristem, post-transcriptional regulation, small RNAs, rose

INTRODUCTION

Important agronomic traits such as yield, visual and sanitary qualities, harvest index and even organoleptic quality are determined by plant architecture in general and shoot branching in particular (Boumaza et al., 2010; Garbez et al., 2015; Zhu and Wagner, 2020). A lot of research efforts are therefore produced to decipher mechanisms that control branching (Rameau et al., 2015;

Roman et al., 2016; Le Moigne et al., 2018; Schneider et al., 2019; Wang M. et al., 2020; Barbier et al., 2021).

Branching relies on the ability of an axillary bud, a structure containing a miniature shoot comprising a meristem, short internodes and immature leaves, to break dormancy and to grow through cell proliferation and expansion into a new branch. Dormancy is complex and includes endo-, para-, and eco-dormancies that can in part overlap (Lang et al., 1987; Cline, 1997). While endodormancy is controlled by mechanisms endogenous to the bud, paradormancy is due to the control of other organs on a given bud, as it is the case in apical dominance. Apical dominance can be lifted by stem beheading (Dun et al., 2006) or by exogenous application of chemical products (Ophir et al., 2009; Suttle, 2009; Walton et al., 2009). Ecodormancy relies on environmental control over a bud. Bud ability to grow out is therefore controlled both by internal factors [i.e., genetic background, hormones, metabolites, reactive oxygen species (ROS)] (Girault et al., 2010; Mason et al., 2014; Barbier et al., 2015; Li-Marchetti et al., 2015; Porcher et al., 2021) and also external ones. Among them, nutrients and water availability (Demotes-Mainard et al., 2013), temperature (Djennane et al., 2014), and light (Djennane et al., 2014; Roman et al., 2016; Porcher et al., 2021) are major determinants. Responses to abiotic factors are indeed critical for the plant to adapt its own development to resource availability, seasons and environmental stresses and to compete with other plants.

Light signal is particularly informative for the plant since it varies in intensity, quality, direction, and duration (Leduc et al., 2014). The shade avoidance syndrome triggered by decreased photosynthetic radiations and R/FR (Red/Far Red) ratio leads for example to axillary bud outgrowth inhibition. Dependence on light for axillary bud growth is varying from one species to another. Some species are able to show axillary bud growth in darkness where in the rosebush, light is particularly essential for this. Indeed, in this species axillary bud outgrowth and organogenesis are totally inhibited and no axillary branches are produced in the absence of light (Girault et al., 2008). Beside rosebush's primary importance among ornamentals, this response has also made it an excellent model for exploring light control of axillary bud outgrowth in plants (Demotes-Mainard et al., 2016; Huché-Thélier et al., 2016).

At the molecular level, most knowledge on axillary bud outgrowth and its photocontrol has been gained at the transcriptional level in the rosebush (Girault et al., 2010; Djennane et al., 2014; Roman et al., 2016; Schneider et al., 2019; Porcher et al., 2020, 2021). Yet, as for other developmental processes, post-transcriptional regulations are likely important and need to be further explored. Some studies have revealed post-transcriptional regulation in axillary bud outgrowth control with post-transcriptional regulation of Rosa *BRANCHED1* (*RhBRC1*) in interaction with sugars and regulation of its 3′UTR region with the potential role of *PUMILIO RNA-BINDING PROTEIN FAMILY 4* (*RhPUF4*) (Wang et al., 2019b).

MicroRNA (miRNA) regulation is a major component of post-transcriptional regulation of all biological processes in eukaryotes. First discovered in *Caenorhabditis elegans* (Wightman et al., 1993), miRNAs are small (20–21 nucleotides) single stranded non-coding RNAs. In *Arabidopsis thaliana*, 728 mature miRNAs have been identified (Kozomara et al., 2019). MiRNAs modulate the expression of their target genes through binding to their mRNA, causing either transcript cleavage or translation inhibition (Voinnet, 2009). Some miRNAs and their targets show a high conservation within plants while non-conserved ones can be found only in a group of plants, a species or even be specific to a landrace (Rajagopalan et al., 2006; Fahlgren et al., 2007). Conserved miRNAs target preferentially genes coding for transcription factors that play important roles in developmental control, while non-conserved target genes code for much more diverse functions (Zhang and Zhang, 2012).

Some knowledge has been gained on the roles of miRNAs in meristem initiation (see reviews by Zhang et al., 2006; Wang et al., 2011; Wu, 2013; Li and Zhang, 2016; Liu et al., 2018) as well as on leaf organogenesis (Pulido and Laufs, 2010; Maugarny-Calès and Laufs, 2018; Yang et al., 2018), two processes that contribute to axillary bud initiation and development (Sussex and Kerk, 2001). However, little is known about the roles of miRNAs during axillary bud outgrowth *per se*. Here, we provide a survey of the current knowledge on this subject, first sketching how the main mechanisms regulating axillary bud outgrowth may be connected to light control. Next, we provide a comprehensive view of axillary bud outgrowth regulation by miRNAs and, exploring the wider literature, we provide hypotheses on how light controls miRNAs activity and may contribute to the photocontrol of axillary bud outgrowth. In a second part, based on our expertise in rosebush and using *in silico* analysis based on the miRNA profiling we performed, we further explored the rose genome to identify and discuss novel miRNAs-gene target couples that may play a potential role in the regulation of axillary bud outgrowth and in its photocontrol in rosebush. Thus, we provide novel hypotheses on the miRNA-mediated regulation of bud growth photocontrol on which future research may stand.

AXILLARY BUD OUTGROWTH AND ITS LIGHT CONTROL: CURRENT KNOWLEDGE ON MAIN ACTORS

Several reviews have recently described in depth the current knowledge on the processes controlling axillary bud outgrowth in plants and their control by light (Leduc et al., 2014; Schneider et al., 2019; Wang M. et al., 2020; Kotov et al., 2021). As a pre-requisite to discuss their possible regulation by miRNAs, we provide here a brief overview of the main actors involved in the photocontrol of axillary bud outgrowth with a particular focus on rosebush. Main actors and their interactions are presented in **Figure 1**.

Main Actors and Their Roles in the Control of Axillary Bud Outgrowth

Axillary bud outgrowth is controlled by a complex interplay between several main actors such as hormones, nutrients in particular sugars and ROS (**Figure 1**).

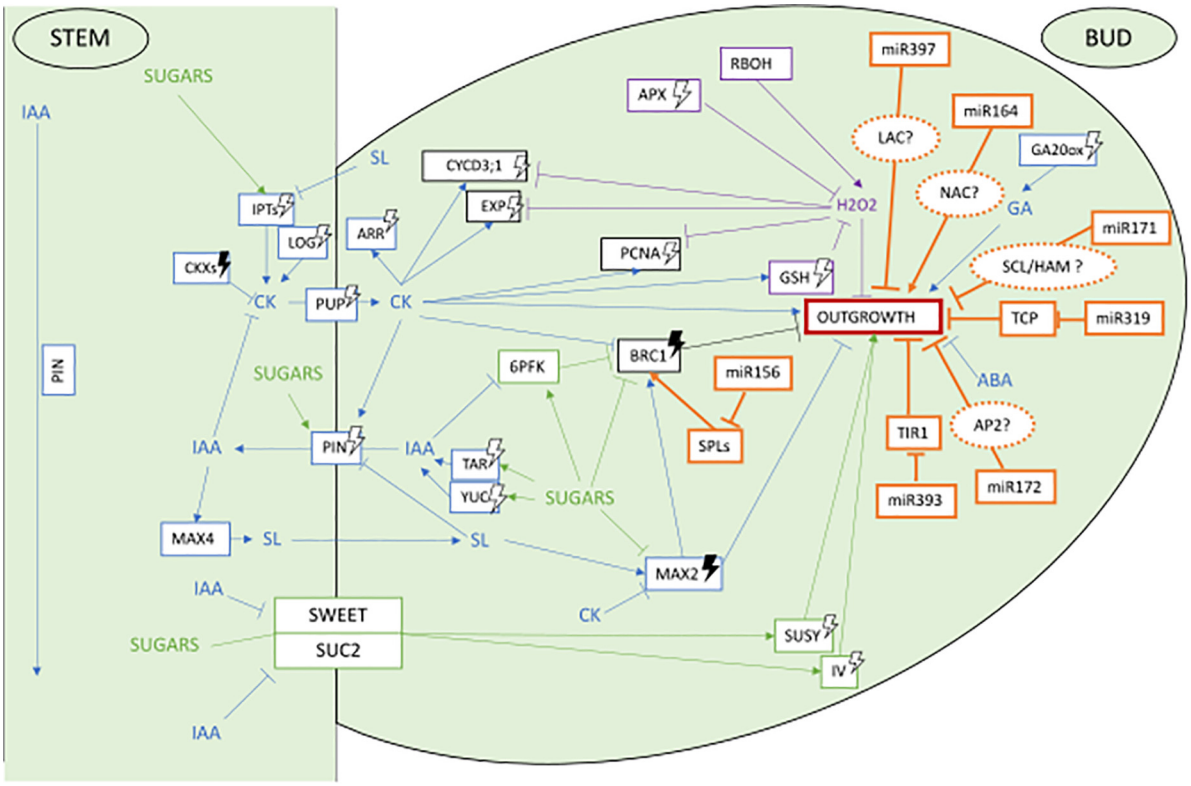

FIGURE 1 | Network of main actors controlling axillary bud outgrowth in the rosebush Rosa 'Radrazz'* and the potential targets of miRNAs based on literature in other plant species** Potential gene targets of these miRNAs in the control of bud outgrowth are represented in dotted orange circles. miRNAs involved in control of bud outgrowth according to the literature are represented in orange. Blue represents hormonal pathway, green sugars pathway, purple ROS pathway. Arrows head means induction, straight lines mean repression, white lightning bolt means induction by light, darked lightning bolts means induction by darkness. *Girault et al. (2008), Girault et al. (2010), Henry et al. (2011), Choubane et al. (2012), Rabot et al. (2012), Rabot et al. (2014), Djennane et al. (2014), Barbier et al. (2015), Roman et al. (2016), Roman et al. (2017), Porcher et al. (2020), Porcher et al. (2021), Wang M. et al. (2021). **Jiao et al. (2010), Miura et al. (2010), Wang et al. (2010), Wei et al. (2012), Xia et al. (2012), Curaba et al. (2013), Zhou et al. (2013), Zhang et al. (2013), Aung et al. (2015), Wang L. et al. (2015), Wang Y. et al. (2015), Huang et al. (2017), Kravchik et al. (2019), Sun et al. (2019), Cui et al. (2020), Lian et al. (2021), Wang R. et al. (2021), Zhan et al. (2021).

Concerning hormones, strong interactions between auxin (IAA), cytokinins (CK), and strigolactones (SL) form a core regulatory hormonal network instrumental for the release of apical dominance and induction of axillary bud outgrowth (Domagalska and Leyser, 2011; Barbier et al., 2019, **Figure 1**, blue lines). A first proposed mechanism suggests IAA inhibits axillary bud outgrowth indirectly through repression of CK synthesis and promotion of SL synthesis and signaling, both hormones being able to enter axillary buds and to act directly on axillary buds (Beveridge et al., 2000; Brewer et al., 2009; Ferguson and Beveridge, 2009). The balance of their opposing effects (CK promoting and SL repressing bud growth) would determine the fate (paradormancy vs. outgrowth) of the axillary bud. Through a second suggested mechanism, the basipetal flux of IAA produced by the apical meristem would also cause inhibition of axillary bud outgrowth by acting on the polarized distribution of the IAA efflux transporters PIN-FORMED (PIN) proteins in the axillary bud and by preventing it to export its own auxin (Bennett et al., 2006; Prusinkiewicz et al., 2009). In addition, a repressive role of ABA on axillary bud outgrowth was demonstrated in several species such as tomato, bean, arabidopsis, and rosebush (Tucker, 1976; Knox and Wareing, 1984; Gocal et al., 1991; Le Bris et al., 1999; Chatfield et al., 2000; Corot et al., 2017). In rosebush, a continued *de novo* synthesis of ABA contributes to maintaining bud endodormancy through control of cell cycle arrest in G2 phase (Le Bris et al., 1999). Application of ABA on the stem of rosebush and of other species also inhibits outgrowth of non-endodormant axillary buds nearby (Chatfield et al., 2000; Cline and Oh, 2006; Corot et al., 2017) while beheading of the main shoot causes a decrease in ABA contents in axillary buds along with their outgrowth (Knox and Wareing, 1984; Gocal et al., 1991). Last, gibberellins (GA) are hormones that control meristem cell differentiation in leaf primordia and internode elongation, both processes taking place during axillary bud outgrowth (Koornneef and van der Veen, 1980; Dodsworth, 2009). In rosebush, GA synthesis under the control of *RoGA20-oxidase* (*RoGA20ox*) and *RoGA3ox* and reduction of GA catabolism through down-regulation of *RoGA2ox* were shown to contribute to axillary bud outgrowth (Choubane et al., 2012).

As providers of energy, osmolytes and cell wall material, sugars are other key players in axillary bud outgrowth control

(Bonicel et al., 1987; Marquat et al., 1999; Le Hir et al., 2006, **Figure 1**, green lines). In the rosebush, pea and sorgho, defoliation, decapitation or *in vitro* experiments showed axillary bud outgrowth is dependent on sucrose availability (Girault et al., 2010; Henry et al., 2011; Kebrom et al., 2012; Rabot et al., 2012; Mason et al., 2014). In rosebush *Rosa* 'Radrazz', *SUCROSE TRANSPORTER 2* (*RhSUC2*) and *RhSWEET10* control sucrose transport to the bud (Henry et al., 2011; Roman et al., 2016) where *RhSUSY* and *VACUOLAR INVERTASE 1* (*RhVI1*) catabolize sucrose into fructose and glucose for growth (Girault et al., 2010; Rabot et al., 2014). Promoting effects of non-metabolizable sucrose analogs on axillary bud outgrowth in rosebush suggests that sucrose may also play a signaling role during axillary bud outgrowth (Rabot et al., 2012; Barbier et al., 2015). Sucrose interacts with the hormonal control of axillary bud outgrowth (Barbier et al., 2015). Using detached rosebush buds *in vitro*, Barbier et al. (2015) showed that sucrose upregulates auxin synthesis [*TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE RELATED 1* (*RhTAR1*), *YUCCA 1* (*RhYUC1*)] and auxin efflux [*PIN-FORMED 1* (*RhPIN1*), *SERINE/THREONINE PROTEIN PHOSPHATASE 2A* (*RhPP2A*), *PINOID* (*RhPID*)] genes in buds and represses strigolactones *MORE AXILLARY BRANCHES 2* (*RwMAX2*) signaling gene. Promoting effect of sucrose onto axillary bud outgrowth also relies on repression of a main negative regulator of axillary bud outgrowth *BRANCHED1* (*BRC1*) (Aguilar-Martínez et al., 2007; Finlayson et al., 2010; Dun et al., 2012; Brewer, 2015; Wang et al., 2019a) by sucrose (Barbier et al., 2015; Wang M. et al., 2021).

Evidence is also repetitively brought showing that the oxidative metabolism contributes to the control of axillary bud outgrowth (**Figure 1**, purple lines). In grape, for example, application of sodium azide or hydrogen cyanamide or heat shock on endodormant buds represses *CATALASE* (*CAT*) scavenging activity, causing accumulation of hydrogen peroxide (H_2O_2) that promotes bud outgrowth (Or et al., 2002; Ophir et al., 2009; Pérez et al., 2009; Vergara et al., 2012; Sudawan et al., 2016; Meitha et al., 2018). In non-endodormant buds, H_2O_2 appears to play an opposite role. Hence, in tomato, *rboh* mutants in which the capacity to produce apoplastic H_2O_2 is altered, a highly branched phenotype is observed suggesting that H_2O_2 contributes to axillary bud outgrowth inhibition (Sagi et al., 2004; Chen et al., 2016). In non-endodormant rosebush axillary buds subjected to apical dominance, a high content of H_2O_2 is present and contributes to bud arrest. Upon stem decapitation, activation of ROS scavenging activity is observed that causes a rapid decrease in H_2O_2 content along with axillary bud outgrowth (Porcher et al., 2020). In rosebush buds, scavenging activity is mainly due to the ascorbate–glutathione cycle (AsA–GSH). Transcription of glutathione biosynthesis genes *RhGSH1* as *RhGSH2* as well as of ascorbate peroxidase *RhAPX1* and glutathione reductase *RhGR1* are indeed actively transcribed in axillary buds after plant beheading and during axillary bud outgrowth while catalase *RhCAT* is not. These up-regulations are followed by increased corresponding enzymatic activities (Porcher et al., 2020).

Suppression of bud dormancies allows axillary bud outgrowth characterized by resumption of DNA replication and cell cycle (Shimizu and Mori, 1998; González-Grandío et al., 2013). Increased transcriptional activity of *PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN* (*PCNA*), *CELL DIVISION CYCLE 2* (*CDC2*), *CYCLIN B* (*CYCB*, Devitt and Stafstrom, 1995), and *CYCLIN D3* (*CYCD3*) takes for example rapidly place in pea (Shimizu and Mori, 1998), apple trees (Li et al., 2018) and in *Rosa* buds (Roman et al., 2016; Porcher et al., 2020) upon dormancy break. Cell division along with cell wall expansion contribute to growth of organ primordia and lead to protrusion of young leaves out of buds scales. In rosebush, up-regulation of *EXPANSINS RhEXPA1, 2,* and *3* take place in axillary buds within a few hours after stem decapitation and is promoted by CK (Roman et al., 2016, 2017).

Light Regulation of Main Actors of Axillary Bud Outgrowth

Spectral quality and light intensity both impact axillary bud outgrowth in a range of herbaceous and perennial species (Leduc et al., 2014; Demotes-Mainard et al., 2016; Huché-Thélier et al., 2016). Unlike other species such as Arabidopsis, tomato, and poplar (Girault et al., 2008), axillary buds of rosebush have an absolute need for light to grow out (Girault et al., 2008). Total inhibition of axillary bud outgrowth under darkness and promotion by light offers a great opportunity to examine the light control of bud outgrowth in this species and to deepen our knowledge of this ecodormancy in plants (Leduc et al., 2014; Demotes-Mainard et al., 2016; Huché-Thélier et al., 2016; Bertheloot et al., 2020).

In the rosebush, red (R) and blue (B) lights promote axillary bud outgrowth while far-red (FR) light is inhibitory (Girault et al., 2008). These responses are consistent with the shade avoidance syndrome of plants. In rosebush, monochromatic blue or red light alone is also able to trigger and sustain all processes involved in axillary bud outgrowth, suggesting cross links and redundancy in the transduction pathways of R and B lights (Abidi et al., 2013). The acrotonic outgrowth pattern observed in rosebush can also be deeply modified by localized dark treatment along the rosebush stem (Djennane et al., 2014) or temporary exposure to low light prior to full light exposure (Demotes-Mainard et al., 2013), indicating fine spatial regulation of axillary bud outgrowth patterns along the stem by light.

Transcriptional control of light over hormones, sugars, ROS, cell division and growth was demonstrated in the rosebush using contrasted lighting conditions (darkness vs. white light, monochromatic vs. white light) and exogenous hormonal and sugar treatments. From these studies, demonstration was made that CK are initial targets of the light control pathway (Roman et al., 2016). More precisely, bud exposure to light triggers a rapid and strong upregulation of genes involved in CK synthesis [*ISOPENTENYLTRANSFERASE* (*RhIPT3*, *RhIPT5*)], activation [*LONELY GUY 8* (*RhLOG8*)], and transport [*PURINE PERMEASE 5* (*RhPUP5*)] and to the repression of CK catabolism gene *CYTOKININ OXIDASE/DEHYDROGENASE 1* (*RhCKX1*). This leads to CK accumulation in nodes and buds which then causes an up-regulation of IAA biosynthesis and transport (*RhYUC1*, *RhPIN1*), sugar (*RhSUSY*, *RhVI*, *RhSUC2*, and *RhSWEET10*) synthesis and transport genes, and repression

of axillary bud outgrowth inhibitory genes (*RhBRC1* and SL signaling *RwMAX2*). CK upregulation during light control of rosebush axillary bud outgrowth also acts through ROS scavenging (Porcher et al., 2021). In particular, the AsA-GSH pathway is activated by light and CK, causing a decrease in H_2O_2 content in bud (Porcher et al., 2021). These light regulations finally lead to axillary bud outgrowth through activation of cell cycle *RhPCNA*, and cell expansion *RhEXPA* genes (Roman et al., 2016, 2017). Additionally, in response to reduced light intensity, Corot et al. (2017) showed that inhibition of axillary bud outgrowth in the rosebush is associated with reduced levels of CK and increased levels of ABA. Exogenous delivery of CK and ABA to the stem confirmed their antagonistic action in the control of axillary bud outgrowth by light intensity (Corot et al., 2017). Light regulation of GA also contributes to the photocontrol of axillary bud outgrowth in the rosebush through upregulation of the expressions of biosynthesis genes *GA20ox* and *GA3ox* and repression of catabolic gene *GA2ox* (Choubane et al., 2012).

In dark, conversely, repression of axillary bud outgrowth results from up-regulation of repressor genes such as *RhBRC1* and SL signaling *RwMAX2* as well as repression of ROS scavenging AsA-GSH pathway (Djennane et al., 2014; Roman et al., 2016; Porcher et al., 2021). Repression of sucrose transport and catabolism under darkness leads to a switch toward sorbitol metabolism, seemingly as a survival mechanism. Strong upregulation of *NAD-DEPENDANT SORBITOL DEHYDROGENASE* (*RhNAD-SDH*) transcriptional activity is indeed observed upon exposure of buds to darkness (Girault et al., 2010).

EXTENDING OUR KNOWLEDGE OF CONSERVED MiRNAS AND THEIR REGULATION OF AXILLARY BUD OUTGROWTH TO ROSEBUSH

Beside the regulatory pathways discussed above, the role of miRNAs in bud outgrowth control was more recently discovered. Numerous miRNAs showing high degree of similarity in their sequence were found in the genomes of many plant species and thus defined as conserved miRNAs (Weber, 2004; Zhang et al., 2006). Some of these were identified as key players in axillary bud outgrowth. Yet, the role of these miRNAs has been explored only in a few model species such as Arabidopsis, maize, and rice, the two latter concentrating on a grass specific branching process, called tillering. Here, we provide an up-to-date summary of roles of conserved miRNAs in branching and provide new data of the putative role of these conserved miRNAs in rosebush. Branching phenotypes of miRNAs and target gene-resistant mutants are summarized in **Table 1**.

The study of tillering in rice (*Oryza sativa*) has been instrumental in uncovering the role of miRNAs in bud outgrowth. To-date, miR156 is one of the best characterized miRNA families. MiR156 plays a major role in regulating shoot branching by targeting a subset of the *SQUAMOSA PROTEIN-LIKE* (*SPLs*) genes. SPL transcription factors are found in all green plants and are involved in many developmental regulatory processes such as phase transition and flowering, plastochron control, leaf development, fruit ripening and response to stresses (Wang and Wang, 2015). *SPL* genes are ordered into nine clades, of which six are regulated by miR156 (Preston and Hileman, 2013). In rice, increased expression level of *OsSPL14* resulting from a mutation in its miR156 binding site leads to reduced branching from vegetative buds (Jiao et al., 2010; Miura et al., 2010). Interestingly, this mutation has opposite effects on branching during the reproductive phase, as it leads to increased inflorescence (panicle) branching and altogether forms the molecular basis of a quantitative locus known as *WEALTHY FARMER'S PANICLE* or *IDEAL PLANT ARCHITECTURE 1 (IPA1)* that improves rice productivity. On the contrary, high miR156 levels increase tiller formation in the dominant *Corngrass1* maize mutant (Chuck et al., 2007). An increased branching resulting from miR156 overexpression was also reported in other species including Arabidopsis (Wei et al., 2012; Tian et al., 2014), alfalfa (Aung et al., 2015), lotus (Wang Y. et al., 2015), soya (Sun et al., 2019), and tomato. In this last species, the increased branching phenotype can be reverted by expression of a miR156-resistant *SPL13* gene (Cui et al., 2020). Modulation of miR156/SPL interaction affects branching through both initiation and outgrowth of the axillary buds (Wang L. et al., 2015). At least three pathways have been associated with such increased branching. First, *UNBRANCHED3*, the maize ortholog of *OsSPL14*, directly targets and represses the expression of cytokinin biosynthesis and signaling genes while promoting expression of cytokinin degradation genes, thus resulting in lower cytokinin levels and signaling (Du et al., 2017). Second, *OsSPL7*, another target of miR156 in rice, represses the expression of *OsGH3.8* which codes for an enzyme conjugating auxin to aspartate (Dai Z. et al., 2018). Hence, miR156 may affect auxin/cytokinin balance that is important for both formation and growth of the axillary meristems. Last, *OsSPL14* directly promotes the expression of *OsTB1*, the rice homolog of bud outgrowth repressor *AtBRC1* (Lu et al., 2013). In this last case, miR156 repression of *OsSPL14* would reduce *AtBRC1* inhibitory effect on bud outgrowth.

The study of tillering in rice has revealed additional miRNAs that contribute to the regulation of branching in this species (Yue et al., 2017). MiR529 that partially overlaps with miR156 also targets a subset of *SPL* genes. MiR529 is found in monocots but was specifically lost in some dicots (Morea et al., 2016). Recently, Yan et al. (2021) showed that modulation of miR529 activity increases rice tillering in a similar way as miR156.

Increased tillering was also observed in rice lines overexpressing miR393. This miRNA targets genes coding for auxin receptors [*TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1* (*OsTIR1*) and *AUXIN SIGNALING F-BOX 2* (*OsAFB2*)]. Accordingly, rice lines overexpressing miR393 show a reduced response to auxin and lower expression of the *OsTB1* gene, which may account for increased axillary bud growth (Li et al., 2016).

Modified auxin signaling is also observed in rice plants expressing a miR160-resistant version of the *AUXIN RESPONSE FACTOR* (*OsARF18)* that develop less tillers (Huang et al., 2016).

TABLE 1 | Main conserved miRNA families and their associated targets causing shoot branching modulation.

miRNA families	Known target	Species	Plants	References
156	SPL	Rice, Lotus, Medicago, Soya, Arabidopsis	MiR-OE: Increased branching	Wei et al., 2012; Aung et al., 2015; Wang L. et al., 2015; Wang Y. et al., 2015; Sun et al., 2019
		Tomato	TG-LF: Increased branching	Cui et al., 2020
		Rice	TG-MR: reduced branching	Jiao et al., 2010; Miura et al., 2010
164	NAC	Arabidopsis, Cotton	MiR-OE: Increased branching TG-MR: Reduced branching	Zhan et al., 2021
171	GRAS/SCL/HAM	Arabidopsis, Barley	MiR-OE: Reduced branching	Wang et al., 2010; Curaba et al., 2013
		Tomato	MiR-LF: Increased branching	Schulze et al., 2010; Wang et al., 2010; Kravchik et al., 2019
		Arabidopsis	TG-LF: Reduced shoot branching	Huang et al., 2017
		Tomato	TG-OE: Increased branching	Wang et al., 2010
		Arabidopsis	TG-MR: Increased branching	
172	AP2	Arabidopsis	MiR-LF: Increased branching	Lian et al., 2021
319	TCP	Bentgrass	MiR-OE: Decreased branching	Zhou et al., 2013
		Rice	MiR-LF: Increased branching	Wang R. et al., 2021
393	TIR1/AFB	Rice	MiR-OE: Increased branching	Xia et al., 2012
397	LAC	Rice	MiR-OE: Decreased branching	Zhang et al., 2013
444	MADS	Rice	MiR-OE: Reduced branching TG-OE: Increased branching TG-MR: Increased branching	Guo et al., 2013
529	SPL	Rice	MiR-OE: Increased tillering MiR-LF: Reduced branching	Yan et al., 2021

MiR-OE, miRNA overexpression phenotype; MiR-LF, miRNA loss-of-function or knock-down phenotype; TG-MR: target resistant phenotype; TG-LF, target loss-of-function or knock-down phenotype; TG-OE, target overexpression phenotype.

While overexpression of miR156, miR529 or miR393 increases rice tillering, overexpression of the monocot-specific miR444 has an opposite effect (Guo et al., 2013). miR444 targets *OsMADS57* which is expressed in developing buds where *OsMADS57* represses expression of *D14* gene coding for the SL receptor. Hence, miR444 overexpression may lead to increased SL response and thus inhibition of bud outgrowth.

Finally, overexpression of miR397 that targets rice *OsLAC*, a laccase polymerizing monolignols into lignin (Berthet et al., 2011; Zhao et al., 2013) also leads to a slight reduction in rice tiller number (Zhang et al., 2013).

Study in *Arabidopsis thaliana* also revealed the potential role of three other miRNAs in the control of branching. For example, miR171 was shown to target genes coding for the GRAS transcription factors *SCARECROW-LIKE SCL6-II*, *SCL6-III*, and *SCL6-IV* [also named *LOST MERISTEMS1-3* (*LOM*) or *HAIRY MERISTEM* (*HAM*)] (Schulze et al., 2010; Wang et al., 2010). These proteins are required for proper meristem function, including axillary meristem formation, and act by promoting the specification of the stem cells in the apical region of the meristem (Zhou et al., 2018; Han et al., 2020). Arabidopsis lines overexpressing miR171 show a massive reduction in the number of secondary branches, which is reverted by the expression of a miR171-resistant version of any of the 3 *HAM* genes (Wang et al., 2010). In tomato also, reduced miR171 activity or overexpression of the tomato *HAM* gene *SlGRAS24* leads to increased branching suggesting that miR171 represses *HAM* gene expression to limit branching in these species (Huang et al., 2017; Kravchik et al., 2019). *SlGRAS24* modulates auxin and gibberellin signaling, but whether it affects the formation of the axillary meristem, or its outgrowth is not known yet (Huang et al., 2017). The function of miR171 in shoot branching inhibition appears to be conserved in monocots, as overexpression of this miRNA reduces branching in barley (Curaba et al., 2013).

In Arabidopsis, miR164 targets a subset of the NAC genes, including *CUP-SHAPED COTYLEDON* (*CUC*) genes that are important for a wide range of meristem-related developmental processes. Recent studies performed in cotton and in the heterologous Arabidopsis system suggest that repression of *CUC2* by miR164 is important for branch outgrowth (Zhan et al., 2021). Specifically, *CUC2* interaction with *BRC1* may modulate ABA levels to control bud growth (Zhan et al., 2021).

An antagonistic role of miR172 and of miR156 in the regulation of Arabidopsis branching was also demonstrated (Wang et al., 2009). The quintuple mutant of the five *MIR172* genes indeed shows an increased branching as does a line overexpressing *MIR156b* (Wei et al., 2012; Lian et al., 2021). *MiR172a* and *d* are the *MIR172* genes playing a major role in the repression of branching in Arabidopsis (Lian et al., 2021).

Research in other less studied plant species has also brought additional knowledge on the role of other miRNAs in branching. For instance, in bentgrass (*Agrostis stolonifera*), overexpression of miR319 leads to a slight decrease in tillering (Zhou et al., 2013). MiR319 targets a subset of the *TEOSINTE*

BRANCHED1/CYCLOIDEA/PCF (*TCP*) transcription factor family which are involved among others in the transition from cell proliferation to differentiation during plant development (Palatnik et al., 2003). In line with these data, recent work in rice shows that inactivation of miR319 correlates with increased expression of *OsTCP21* and increased number and length of tiller buds (Wang R. et al., 2021). In *Camellia sinensis*, the expression of *MIR319c* is significantly reduced during bud outgrowth while that of its target *TCP2* is significantly upregulated (Liu et al., 2019).

Altogether, it appears that several conserved miRNAs contribute to branching control. While in some cases, their effect could be precisely attributed to meristem initiation or to their later outgrowth (Wang L. et al., 2015), this has not been systematically analyzed (Huang et al., 2017; Lian et al., 2021). In addition, as some of these miRNA/target couples are involved in many processes, the effect on branching could be sometimes indirect. This may be the case for example for miR156 that affects the duration of the vegetative phase and therefore the number of nodes bearing axillary meristems.

As described in part 1, a lot of information has been gained on axillary bud outgrowth regulatory pathways and its photocontrol through study of the rosebush *Rosa* 'Radrazz'. However, the role of miRNAs in rosebush axillary bud outgrowth has not yet been explored. As a first step toward this, we analyzed whether the conserved miRNAs described in **Table 1** were also expressed in rosebush axillary buds and if they could interact with the same known targets. To answer these questions and since no annotation of the mature miRNA sequences is available on the reference *Rosa* genome (*Rosa chinensis*, Hibrand Saint-Oyant et al., 2018; Raymond et al., 2018), we performed a high throughput profiling of the miRNA components of *Rosa* 'Radrazz' axillary buds. To induce axillary bud outgrowth, stems were beheaded to release apical dominance and were grown in light. We collected buds samples right after beheading and 6 h after beheading. This time point was chosen as it was late enough after beheading to allow key molecular mechanisms of the outgrowth process and of the light control to take place (Barbier et al., 2015; Roman et al., 2016; Porcher et al., 2020, 2021; Method detailed in **Supplementary Method I**) and early enough to minimize feed-back loop regulations of miRNAs that could be activated following resumption of axillary meristem outgrowth. From the sequenced small RNAs, prediction and annotation of the *Rosa* mature miRNAs sequences were achieved using *Arabidopsis thaliana* miRNAs database[1] (**Supplementary Data 1**). Annotated *Rosa* miRNAs sequences were next aligned against orthologs of the known target genes described in literature (**Table 1**) and found in *Rosa chinensis* genome using target prediction web server's psRNAtarget (Dai X. et al., 2018).[2] Together this allowed us to take a snapshot of miRNAs present in buds upon suppression of apical dominance and during an early phase of bud growth and then predict their targets in *Rosa* (**Table 2**).

[1]http://www.mirbase.org/index.shtml

[2]https://www.zhaolab.org/psRNATarget/

Our bioinformatic analysis shows that out of the 9 miRNAs families previously described as involved in the control of bud outgrowth (as mentioned above), 7 were found in *Rosa* (**Table 2**). The two missing families, miR444 and mi529, are also missing in other dicots. This result reinforces the hypothesis that miR529 was lost in eudicots during evolution and that miR444 is only present in monocots (Sunkar et al., 2005; Ortiz-Morea et al., 2013). Each *Rosa* miRNA family is represented by several members (i.e., 14 in miR156 family; 7 in miR164 family). Similar numbers of members were found in Arabidopsis except for miR171, 172, and 319 families in which a much lower number of members were identified in *Arabidopsis* (6, 9, and 3 members, respectively) in comparison to *Rosa*. This may suggest differences in the tuning of the regulations controlled by these miRNA families between *Rosa* and *Arabidopsis*.

Binding ability of *Rosa* miRNAs to known targets was predicted by searching sequences complementary to the miRNAs in the putative targets. Same target gene families were found in the *Rosa* genome as described for other species (**Table 1**). These findings suggest that regulations involving these miRNA families and their associated targets may also be conserved in *Rosa* axillary buds.

Bioinformatic analysis allowed identification of several members of each target gene family in *Rosa* (**Table 2**). Further experimental investigations are needed for confirmation of their interaction.

Results are summed up in orange in **Figure 1** showing the network of main actors controlling axillary bud outgrowth in the rosebush Rosa 'Radrazz' and the potential roles of miRNAs based on literature in other plant species and the miRNA/target pairs we identified here.

CROSSTALK BETWEEN LIGHT SIGNALING PATHWAY AND MiRNAS ENCODING GENE EXPRESSION

Light is a major environmental cue that controls bud outgrowth in many plant species and light regulation of axillary bud outgrowth at transcriptional level has been well documented in rosebush (Girault et al., 2008; Rabot et al., 2014; Roman et al., 2016; Porcher et al., 2020). Yet, little is known to-date on the involvement of miRNAs in light-mediated axillary bud outgrowth mechanisms. Therefore, we summarize here the present knowledge on light effects on the miRNA pathway in general, affecting for instance the stability or functionality of the core proteins involved in the maturation of miRNAs (Sánchez-Retuerta et al., 2018; Park et al., 2021). In addition to such a general effect on the whole miRNA pathway, light also affects the expression of some *MiRNA* genes specifically. Red (R) and Blue (B) light signal transduction engages photoreceptors, including phytochromes (PHY) and cryptochromes (CRY) and their downstream effectors as *ELONGATED HYPOCOTYL 5* (*HY5*) and *PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS* (*PIF4*). *PHYB* plays a main role in the photocontrol of bud outgrowth (Kebrom and Mullet, 2016). Recently, Holalu et al. (2020) reported that PIF4 and PIF5 contribute to the suppression of

TABLE 2 | Conserved miRNAs expressed in *Rosa* 'Radrazz' buds and their predicted gene targets.

Conserved miRNA families	Total number of miRNA family members identified in *Rosa* 'Radrazz' buds and names of those presenting binding ability to known target identified in other plants species	Target genes identified in *Rosa chinensis* genome with an expectation ≤3.5.	*Rosa chinensis* homologs accession number (Hibrand Saint-Oyant et al., 2018)	*Arabidopsis thaliana* orthologs accession number (TAIR 10 release)
156	14	*SPL2*	RC4G0346800	AT5G43270
	miR156c/miR156f/ miR156c_1/miR156k_ 1/ miR156a/miR156a-5p/ miR156j_1/miR156k_2/ miR156_2/miR156g_1	*SPL3*	RC5G0081600	AT2G33810
		SPL6A	RC4G0415800	AT1G69170
		SPL6B	RC7G0063500	AT1G69170
		SPL6C	RC7G0063900	AT1G69170
		SPL9	RC3G0139500	AT2G42200
		SPL10	RC1G0282700	AT1G27370
		SPL13A	RC7G0120000	AT5G50570
		SPL16A	RC2G0684700	no SPL16 in
		SPL16B	RC4G0344900	Arabidopsis
164	7	*NAC1*	RC5G0238100	AT1G56010
	miR164a_2/miR164a_4/miR164b/164e-5p/ miR164f_1	*NAC100_1*	RC7G0049200	AT5G61430
		NAC100_2	RC7G0049800	AT5G61430
		NAC100_3	RC2G0616000	AT5G61430
		CUC2	RC0G0187100	AT5G53950
171	19	*SCL6*	RC1G0287300	AT4G00150
	miR171b/miR171b-3p/miR171b-3p_3/miR171f-3p/miR171a-3p/miR171a-3p_1/miR171a_3/ miR171b_2/miR171b_ 3/miR171_2/miR171c_3/ miR171d_1/miR171f_3	*SCL6*	RC7G0240100	AT4G00150
172	17	*RAP*	RC1G0423500	AT2G28550
	miR172a_4/miR172i/miR172a_2/miR172a_3/ miR172c-3p/miR172d_2/miR172e-3p_1/ miR172a_1/miR172b/miR172e-3p/miR172g-3p/ miR172f	*2.7/TOE 1*	RC5G0530900	AT2G28550
		RAP	RC2G0197000	AT4G36920
		2.7/TOE 1	RC3G0243000	AT5G67180
		AP2		
		TOE3		
319	11	*TCP2*	RC5G0134300	AT4G18390
	miR319_1/miR319a_1/miR319a-3p/ miR319c_1/miR319f_1/ miR319g/miR319a/ miR319b_1/miR319c_2	*TCP4*	RC5G0279600	AT3G15030
393	8	*AFB2*	RC2G0688700	AT3G26810
	miR393a_1/miR393a_3/miR393-5p/miR393a/ miR393a-5p/miR393b-5p/miR393h	*TIR1*	RC6G0421400	AT3G62980
397	3	*LAC2*	RC5G0566900	AT2G29130
	miR397-5p_1/miR397a_6/miR397a_3	*LAC3*	RC5G0617100	AT2G30210
		LAC4A	RC3G0283200	AT2G38080
		LAC4B	RC5G0590200	AT2G38080
		LAC7A	RC3G0278900	AT3G09220
		LAC7B	RC5G0655700	AT3G09220
		LAC11A	RC6G0173800	AT5G03260
		LAC11B	RC6G0174100	AT5G03260
		LAC11C	RC6G0176400	AT5G03260
		LAC11D	RC6G0176600	AT5G03260
		LAC11E	RC6G0177800	AT5G03260
		LAC11F	RC6G0181300	AT5G03260
		LAC17A	RC3G0261900	AT5G60020
		LAC17B	RC3G0262200	AT5G60020
		LAC17C	RC5G0533800	AT5G60020

Conserved Rosa 'Radrazz' mature miRNAs were identified from small RNA high throughput sequencing of axillary buds upon beheading and 6 h after beheading under light conditions. Target prediction was achieved using the web server's psRNAtarget (Dai X. et al., 2018; https://www.zhaolab.org/psRNATarget/) by using an expectation ≤3.5 to avoid false positive results. For target genes, corresponding accession numbers of Rosa chinensis homologs and Arabidopsis thaliana orthologs are indicated.

branching resulting from *phyB* loss-of-function and a low R/FR ratio. This phenotype is correlated to *BRC1* expression induction by PIF4/PIF5 and to abscisic acid (ABA) accumulation in axillary buds. Interestingly, several reports indicated that modulation of miRNA expression may contribute to the PHY-mediated light response, raising the hypothesis that this may contribute to branching modulation. For instance, analysis of miRNAs and their PHYB-mediated targets in rice leaves identified a total of 135 miRNAs differentially expressed between the WT and *phyB* mutant (Sun et al., 2015). This finding suggests that these miRNAs are directly or indirectly controlled by PHYB and participate in PHYB-mediated light signaling. In the same line, HY5 and PIFs transcription factors were reported to directly control the expression of several miRNA genes (Zhang et al., 2011; Xie et al., 2017). More recently, in Arabidopsis, PIF4 was reported to promote expression of genes encoding miR156/157, miR160, miR165/166, miR167, miR170/171, and miR394 and to reduce the expression of the genes encoding miR172 and miR319 by binding to the promoters of these miRNA genes (Sun et al., 2018). Compared to wild type, corresponding miRNA mutants had altered hypocotyl phenotypes, supporting a role for specific miRNAs in photomorphogenesis (Sun et al., 2018). In the extremophile plant *Eutrema salsugineum* under long-term action of R, Pashkovskiy et al. (2021) reported an increase in the expression of *PHYA*, *PHYB*, and *PHYC* as well as of *PIF4* and *PIF5* together with that of miR395, miR408 and miR165. In addition, they also observed a decrease in *HY5*, *miR171*, *miR157*, and *miR827* expressions. These data suggest that the quantity of these miRNAs in *E. salsugineum* is light-regulated in a PHY and PIF-mediated manner. Also, in *Solanum tuberosum* leaves, R light can induce miR398, 399, 408, 482, 8036, and 8049 expressions (Qiao et al., 2017). Among miRNAs whose expression is regulated by light, some (miRNA156, 171, 172, and 319) are involved in branching control (**Table 1**). These observations thus indicate that light *via* a PHY-dependent pathway may control bud outgrowth through modifying the expression of several miRNAs.

A key event in bud outgrowth is the initiation and expansion of leaves. While no experimental data report direct interaction between light signaling and miRNAs biogenesis in the control of leaf organogenesis during bud outgrowth, some works demonstrate that light regulates leaf expansion (Romanowski et al., 2021), and this partly occurs through miRNAs regulation (Pashkovskiy et al., 2016). Hence, Pashkovskiy et al. (2016) reported that blue light causes a significant increase in *miR167* expression which decreases the level of auxin-dependent *ARF6* transcripts in *Arabidopsis* leaves, thereby allowing leaf expansion. ARF transcription factors play an important role in the auxin-mediated gene transcription pathway by interacting with Aux/IAAs proteins, a key pathway involved in bud outgrowth (Vanneste and Friml, 2009; Dierck et al., 2016). In the same line, blue light (B) specifically down-regulates miR156 and miR157 and upregulates their target genes *SPL9* and *SPL15* during *Brassica rapa* subsp. Rapa seedling development (Zhou et al., 2016). These results, combined to increase shoot branching phenotype caused by *miR156* overexpression in *Brassica napus* (Wei et al., 2010), support the hypothesis of a crosstalk between light signaling and miRNAs regulation and suggest miR156/SPL couple acts as regulatory hub of bud outgrowth in response to light. More recently, Dong et al. (2020), found 20 miRNAs differentially expressed in tomato leaves after blue light treatment. Among them, *sly-miR9472-3p* expression is up-regulated by blue light treatment and is negatively correlated to the expression of its target gene *IPT5*, a cytokinin biosynthesis gene which plays a crucial role in promoting axillary bud outgrowth (Barbier et al., 2015; Roman et al., 2016). All these data suggest that miRNAs may well be involved in the light control of leaf expansion during bud outgrowth.

BIOINFORMATIC ANALYSIS OF PUTATIVE NEW MiRNAs IN THE CONTROL AND PHOTOCONTROL OF BUD OUTGROWTH IN *ROSA*

As described above, rosebush is a pertinent model to understand how light controls axillary bud outgrowth. Since little has been described on the role of miRNAs in the photocontrol of axillary bud outgrowth, we took advantage of the rose model to further examine whether components of the axillary bud outgrowth regulatory network (**Figure 1**) may be targets of post-transcriptional regulation *via* miRNAs.

To address this question, full length sequences of genes from this network were identified on *Rosa chinensis* genomes (Hibrand Saint-Oyant et al., 2018; Raymond et al., 2018) and confronted against the mature miRNAs sequences we identified in *Rosa* axillary bud from small RNA-seq using target prediction web server's psRNAtarget (Dai X. et al., 2018; see text footnote 2) (**Supplementary Table 1**).

Our bioinformatic analysis reveals that 9 out of the sixty-five genes related to axillary bud outgrowth and its photocontrol in *Rosa* are predicted to be targeted by 7 miRNA families. These families are conserved in plants. Out of these 7 miRNAs, only miR156 and miR164 have already been described as involved in control of bud outgrowth (**Table 1**). On the contrary, five miRNAs (miR159, miR166, miR399, miR477, and miR8175) were not yet identified for a possible role in the control of bud outgrowth but were characterized for other functions. This could be either because their contribution to axillary bud outgrowth could be masked by the action of other more prominent miRNAs or, alternatively, because the strict light dependence of rosebush axillary bud outgrowth involves novel regulatory circuits that are less conserved in other species, and thus less characterized. MiR159 has been reported in growth transition, programmed cell death, and seed germination (Reyes and Chua, 2007; Alonso-Peral et al., 2010; Guo et al., 2017). MiR166 is implicated in different developmental processes such as regulation of shoot meristem development (Zhang and Zhang, 2012), root growth and development (Boualem et al., 2008; Singh et al., 2014) and seed maturation (Tang et al., 2012). MiR399 has been studied for its role in phosphate homeostasis and starvation (Baek et al., 2013; Tian et al., 2018). For the two last, miR477 and miR8175, to date little data is available concerning their biological function. MiR477 is implicated in plant immunity in *Camellia sinensis*

and in *Gossypium hirsutum* (Hu et al., 2020; Wang S. et al., 2020), while miR8175 has been studied in *Arabidopsis thaliana* roots, and found to be upregulated by high-light intensity (Anna et al., 2019).

Among the nine genes identified as predicted targets, three genes participate in hormone signaling including two genes involved in the cytokinin pathway (*RhCKX1*, *RhCKX6*) both targeted by *miR159a_1* and one in the strigolactones pathway (*RwMAX4*) targeted by six miR166 members. These genes are involved in the repression of bud outgrowth in *Rosa*. Interestingly, none of the genes involved in auxin and gibberellin pathways are found as potential targets of post-transcriptional regulation *via* miRNAs. Concerning sugar control, two genes (*RhSUSY1*, *Rh6PFK*) are targeted by two different miRNAs: *miR8175* and *miR166e-5p*, respectively. Besides hormonal and sugar control, two genes involved in ROS metabolism are potential targets of miRNAs. The first one, *RhAPX1*, encoding antioxidant enzyme is targeted by three miR164 isoforms (miR164a_4, 164b, and 164e-5p), the other one (*RhRBOHB1*) encoding a NADPH oxidase is targeted by *miR399e_5*. Finally, two genes involved in the cell division (*RhCYCD3*;2) and expansion (*RhEXPA3*) are identified as potential targets of miR477e and miR156j_1, respectively. The validation of the interaction between these 7 miRNAs and the predicted rosebush targets awaits experimental confirmation. It is however noteworthy that, in agreement with our findings, miR159 was previously shown as targeting CKX with negative correlation of their expression in response to pathogens in poplar (Zhao et al., 2012). Furthermore, suppressing miR159 leads to a decreased expression of the CK synthesis gene, *OsIPT*, of CK signaling genes *OsRR* and of the CK degradation genes *OsCKX* in rice (Zhao et al., 2017). Taken together, these data suggest that miR159 may play a role in cytokinin metabolism and signaling and support our prediction of miR159 targeting two *CKX* in rosebush during bud outgrowth.

Our study reveals that even though few genes of the regulatory network of axillary bud outgrowth appear under miRNA regulation, most of the pathways identified in *Rosa* are potential targets of miRNA regulation (**Figure 2**). This suggests that miRNAs act on multiple pathways of the complex network regulating bud outgrowth in rosebush. Interestingly, six of the nine identified genes targeted by miRNAs have a light regulated expression (**Supplementary Table 1**). This brings up the hypothesis that their respective associated miRNAs might potentially act in the light transduction pathway (**Figure 2**).

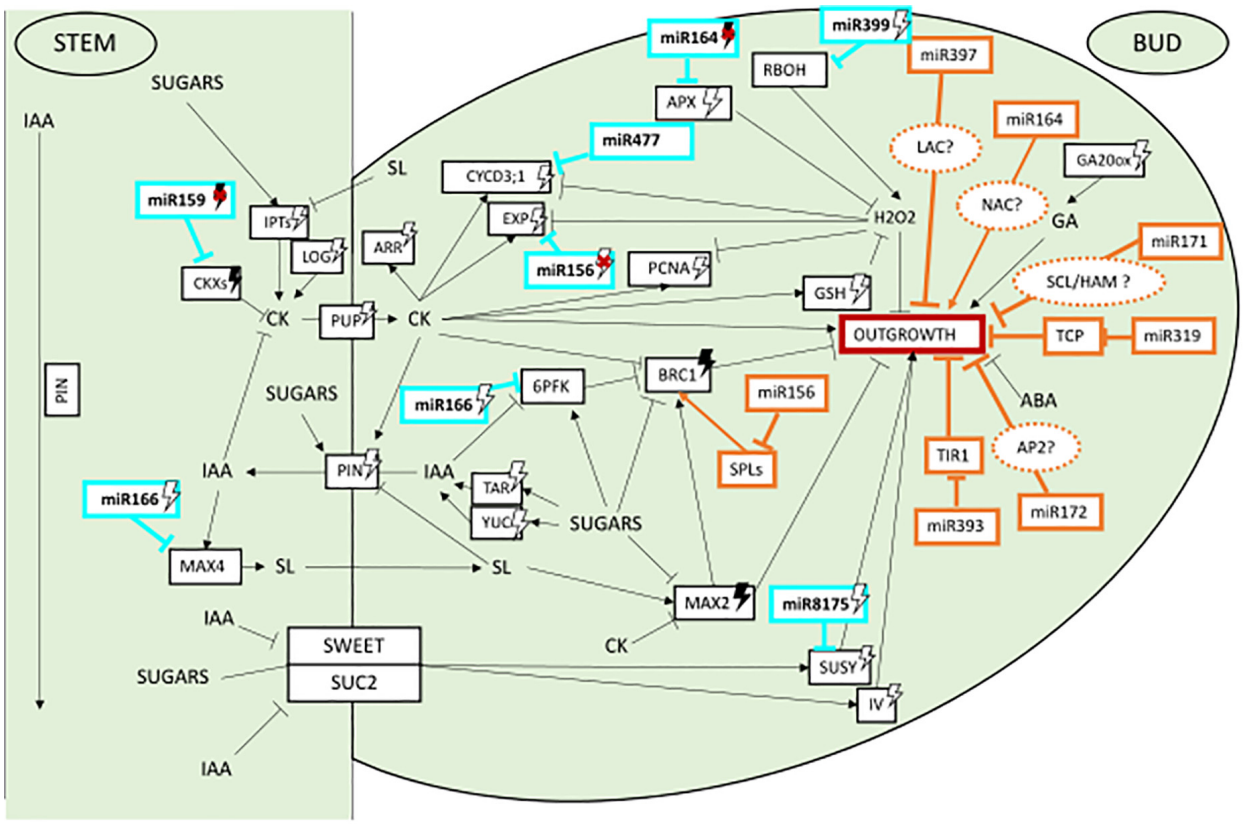

FIGURE 2 | Potential role of miRNAs in the control of axillary bud outgrowth and their light regulation in plants. In bright blue miRNAs identified in the present study as putative novel regulators in control of bud outgrowth. Black arrows heads mean induction, straight lines mean repression, white lightning bolt means induction by light, darked lightning bolt means induction by darkness, red cross means repression of the miRNA.

Further studies addressing the light regulation of these miRNAs in rosebush will be required to progress in the understanding of their role during axillary bud outgrowth.

The other two miRNAs identified here, miR156 and miR164 were already described to play a role in regulating shoot branching (as mentioned above). While miR156j_1 *Rosa* isoform and the 3 miR164 *Rosa* isoforms are predicted to bind to their conserved targets *SPL* and *NAC* (Laufs et al., 2004; Wang and Wang, 2015; Blein and Laufs, 2016; Xu et al., 2016), new targets were also identified by our analysis: *EXPA3* and *APX1*, respectively, both genes being light-regulated during bud outgrowth in *Rosa* (**Supplementary Table 1**). The Arabidopsis orthologs of these Rosa targets (*AtEXP15* and *AtAPX1*) lack a binding site for the miRNA (data not shown). Therefore, it is attractive to speculate that the addition of these new targets may have appeared by evolution of their sequence to create a novel miRNA binding site. The resulting bifurcated pathway downstream the miRNA, with one conserved branch (*SPL* or *NAC*) and one branch more species-specific (*EXPA3* or *APX1*) could provide robustness to the effect of the miRNA on bud outgrowth.

CONCLUSION AND FUTURE PERSPECTIVES

Multiple regulators have been described as acting in concert to fine tune, in an intricate network, axillary bud outgrowth as well as its photoregulation. While this network is mostly built on integrating knowledge gained at the transcriptional level, little is known to date about how post-transcriptional regulation fits into this network. Here, we provide new information by integrating post-transcriptional regulation of the photocontrol bud growth into this network. Based on the literature published mainly on Arabidopsis, rice and maize combined with our bioinformatic analysis on *Rosa* we explored specifically the potential role of miRNAs in the control of bud growth and how they may manage to interact with this network. Thus, we identified through bioinformatic analysis some conserved miRNAs families and their associated target genes as good candidates to play a potential role in the control of axillary bud outgrowth in the rosebush. Interestingly, these miRNAs have the ability to target key molecular players in all major pathways regulating bud outgrowth (including hormones, sugars, and ROS) with a far broader spectrum compared to previously reported studies. Additionally, according to literature, several of those such as miR156, miR164, miR166, and miR8175 are under light regulation which leads us to suggest that they may participate in the light-mediated mechanisms of axillary bud outgrowth. Whether or not these novel miRNA-gene target couples physically interact and demonstrate a biological relevance in the regulation of bud outgrowth and its photocontrol is still to be addressed. To this end, we need to move toward functional analysis and use of mutants.

Involvement of post-transcriptional factors in bud outgrowth control is not limited to miRNAs. Indeed, some studies have brought to light the possible role of small interfering RNAs (siRNAs) in this process (Ortiz-Morea et al., 2013; Kamthan et al., 2015). In this purpose, future research should be conducted to identify precisely which small RNAs are involved using deep sequencing and understand how they interact with miRNAs in the control of axillary bud outgrowth.

The understanding of the mechanisms behind miRNA control of bud outgrowth could be a great opportunity for improving agriculturally important traits such as plant architecture (Boumaza et al., 2010; Leduc et al., 2014; Huché-Thélier et al., 2016). Notably, it was shown recently that plant 5′ of primary miRNA contains a short open reading-frame (ORF) that encodes a peptide called micro-peptide (miPEPs). These miPEPs can raise the mature miRNA level by enhancing the transcription of their associated primary miRNA in a specific manner (Lauressergues et al., 2015). For that miPEPs could be used as powerful tools to lead to agronomic traits improvement under miRNA control (Couzigou et al., 2015).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JM, PL, NL, and JLG designed the experiments and wrote the manuscript. JM performed the experiments and bio informatic analysis. PL, NL, and JLG supervised the work. All authors read and approved the final manuscript.

FUNDING

This work was supported by University of Angers and Pays de la Loire Region, project ROSAPEPS funded by RFI-Objectif Vegetal. The IJPB benefits from the support of Saclay Plant Sciences-SPS (ANR-17-EUR-0007). JM was the recipient of a Ph.D. scholarship from the Ministére de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Nathalie Brouard and Anita Lebrec for their help in bud sampling. We are most grateful to the ImorPhen core facility (Angers, France) for its technical support.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.770363/full#supplementary-material

REFERENCES

Abidi, F., Girault, T., Douillet, O., Guillemain, G., Sintes, G., Laffaire, M., et al. (2013). Blue light effects on rose photosynthesis and photomorphogenesis: blue light and rose development. *Plant Biol.* 15, 67–74. doi: 10.1111/j.1438-8677.2012.00603.x

Aguilar-Martínez, J. A., Poza-Carrión, C., and Cubas, P. (2007). *Arabidopsis* BRANCHED1 Acts as an Integrator of Branching Signals within Axillary Buds. *Plant Cell* 19, 458–472. doi: 10.1105/tpc.106.048934

Alonso-Peral, M. M., Li, J., Li, Y., Allen, R. S., Schnippenkoetter, W., Ohms, S., et al. (2010). The MicroRNA159-Regulated *GAMYB-like* Genes Inhibit Growth and Promote Programmed Cell Death in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 154, 757–771. doi: 10.1104/pp.110.160630

Anna, B.-B., Grzegorz, B., Marek, K., Piotr, G., and Marcin, F. (2019). Exposure to High-Intensity Light Systemically Induces Micro-Transcriptomic Changes in *Arabidopsis thaliana* Roots. *Int. J. Mol. Sci.* 20:5131. doi: 10.3390/ijms20205131

Aung, B., Gruber, M. Y., Amyot, L., Omari, K., Bertrand, A., and Hannoufa, A. (2015). MicroRNA156 as a promising tool for alfalfa improvement. *Plant Biotechnol. J.* 13, 779–790. doi: 10.1111/pbi.12308

Baek, D., Kim, M. C., Chun, H. J., Kang, S., Park, H. C., Shin, G., et al. (2013). Regulation of *miR399f* Transcription by AtMYB2 Affects Phosphate Starvation Responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 161, 362–373. doi: 10.1104/pp.112.205922

Barbier, F. F., Cao, D., Fichtner, F., Weiste, C., Perez-Garcia, M., Caradeuc, M., et al. (2021). HEXOKINASE1 signalling promotes shoot branching and interacts with cytokinin and strigolactone pathways. *New Phytol.* 231, 1088–1104. doi: 10.1111/nph.17427

Barbier, F. F., Dun, E. A., Kerr, S. C., Chabikwa, T. G., and Beveridge, C. A. (2019). An Update on the Signals Controlling Shoot Branching. *Trends Plant Sci.* 24, 220–236. doi: 10.1016/j.tplants.2018.12.001

Barbier, F., Péron, T., Lecerf, M., Perez-Garcia, M.-D., Barrière, Q., Rolčík, J., et al. (2015). Sucrose is an early modulator of the key hormonal mechanisms controlling bud outgrowth in *Rosa hybrida*. *J. Exp. Bot.* 66, 2569–2582. doi: 10.1093/jxb/erv047

Bennett, T., Sieberer, T., Willett, B., Booker, J., Luschnig, C., and Leyser, O. (2006). The *Arabidopsis* MAX Pathway Controls Shoot Branching by Regulating Auxin Transport. *Curr. Biol.* 16, 553–563. doi: 10.1016/j.cub.2006.01.058

Bertheloot, J., Barbier, F., Boudon, F., Perez-Garcia, M. D., Péron, T., Citerne, S., et al. (2020). Sugar availability suppresses the auxin-induced strigolactone pathway to promote bud outgrowth. *New Phytol.* 225, 866–879. doi: 10.1111/nph.16201

Berthet, S., Demont-Caulet, N., Pollet, B., Bidzinski, P., Cézard, L., Le Bris, P., et al. (2011). Disruption of *LACCASE4* and *17* Results in Tissue-Specific Alterations to Lignification of *Arabidopsis thaliana* Stems. *Plant Cell* 23, 1124–1137. doi: 10.1105/tpc.110.082792

Beveridge, C. A., Symons, G. M., and Turnbull, C. G. N. (2000). Auxin Inhibition of Decapitation-Induced Branching Is Dependent on Graft-Transmissible Signals Regulated by Genes *Rms1* and *Rms2*. *Plant Physiol.* 123, 689–698. doi: 10.1104/pp.123.2.689

Blein, T., and Laufs, P. (2016). "MicroRNAs (miRNAs) and Plant Development," in *eLS*, (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd), eds John Wiley & Sons, Ltd. 1–11. doi: 10.1002/9780470015902.a0020106.pub2

Bonicel, A., Haddad, G., and Gagnaire, J. (1987). Seasonal variations of starch and major soluble sugars in the different organs of young poplars. *Plant Physiol. Biochem.* 25, 451–459.

Boualem, A., Laporte, P., Jovanovic, M., Laffont, C., Plet, J., Combier, J.-P., et al. (2008). MicroRNA166 controls root and nodule development in *Medicago truncatula*. *Plant J.* 54, 876–887. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03448.x

Boumaza, R., Huché-Thélier, L., Demotes-Mainard, S., Coz, E. L., Leduc, N., Pelleschi-Travier, S., et al. (2010). Sensory profiles and preference analysis in ornamental horticulture: the case of the rosebush. *Food Qual. Prefer.* 21, 987–997. doi: 10.1016/j.foodqual.2010.05.003

Brewer, P. B. (2015). - Plant Architecture The Long and the Short of Branching in Potato. *Curr. Biol.* 25, R724–R725.

Brewer, P. B., Dun, E. A., Ferguson, B. J., Rameau, C., and Beveridge, C. A. (2009). Strigolactone Acts Downstream of Auxin to Regulate. bud outgrowth in pea and *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 150, 482–493.

Chatfield, S. P., Stirnberg, P., Forde, B. G., and Leyser, O. (2000). The hormonal regulation of axillary bud growth in *Arabidopsis*. *Plant J.* 24, 159–169. doi: 10.1046/j.1365-313x.2000.00862.x

Chen, X., Xia, X., Guo, X., Zhou, Y., Shi, K., Zhou, J., et al. (2016). Apoplastic H_2O_2 plays a critical role in axillary bud outgrowth by altering auxin and cytokinin homeostasis in tomato plants. *New Phytol.* 211, 1266–1278. doi: 10.1111/nph.14015

Choubane, D., Rabot, A., Mortreau, E., Legourrierec, J., Péron, T., Foucher, F., et al. (2012). Photocontrol of bud burst involves gibberellin biosynthesis in Rosa sp. *J. Plant Physiol.* 169, 1271–1280. doi: 10.1016/j.jplph.2012.04.014

Chuck, G., Cigan, A. M., Saeteurn, K., and Hake, S. (2007). The heterochronic maize mutant Corngrass1 results from overexpression of a tandem microRNA. *Nat. Genet.* 39, 544–549. doi: 10.1038/ng2001

Cline, M. G. (1997). Concepts and terminology of apical dominance. *Am. J. Bot.* 84, 1064–1069. doi: 10.2307/2446149

Cline, M. G., and Oh, C. (2006). A Reappraisal of the Role of Abscisic Acid and its Interaction with Auxin in Apical Dominance. *Ann. Bot.* 98, 891–897. doi: 10.1093/aob/mcl173

Corot, A., Roman, H., Douillet, O., Autret, H., Perez-Garcia, M.-D., Citerne, S., et al. (2017). Cytokinins and Abscisic Acid Act Antagonistically in the Regulation of the Bud Outgrowth Pattern by Light Intensity. *Front. Plant Sci.* 8:1724. doi: 10.3389/fpls.2017.01724

Couzigou, J.-M., Lauressergues, D., Bécard, G., and Combier, J.-P. (2015). miRNA-encoded peptides (miPEPs): a new tool to analyze the roles of miRNAs in plant biology. *RNA Biol.* 12, 1178–1180. doi: 10.1080/15476286.2015.1094601

Cui, L., Zheng, F., Wang, J., Zhang, C., Xiao, F., Ye, J., et al. (2020). miR156a-targeted SBP-Box transcription factor SlSPL13 regulates inflorescence morphogenesis by directly activating *SFT* in tomato. *Plant Biotechnol. J.* 18, 1670–1682. doi: 10.1111/pbi.13331

Curaba, J., Talbot, M., Li, Z., and Helliwell, C. (2013). Over-expression of microRNA171 affects phase transitions and floral meristem determinancy in barley. *BMC Plant Biol.* 13:6. doi: 10.1186/1471-2229-13-6

Dai, X., Zhuang, Z., and Zhao, P. X. (2018). psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release). *Nucleic Acids Res.* 46, W49–W54. doi: 10.1093/nar/gky316

Dai, Z., Wang, J., Yang, X., Lu, H., Miao, X., and Shi, Z. (2018). Modulation of plant architecture by the miR156f–OsSPL7–OsGH3.8 pathway in rice. *J. Exp. Bot.* 69, 5117–5130. doi: 10.1093/jxb/ery273

Demotes-Mainard, S., Huché-Thélier, L., Morel, P., Boumaza, R., Guérin, V., and Sakr, S. (2013). Temporary water restriction or light intensity limitation promotes branching in rose bush. *Sci. Hortic.* 150, 432–440. doi: 10.1016/j.scienta.2012.12.005

Demotes-Mainard, S., Péron, T., Corot, A., Bertheloot, J., Le Gourrierec, J., Pelleschi-Travier, S., et al. (2016). Plant responses to red and far-red lights, applications in horticulture. *Environ. Exp. Bot.* 121, 4–21. doi: 10.1016/j.envexpbot.2015.05.010

Devitt, M. L., and Stafstrom, J. P. (1995). Cell cycle regulation during growth-dormancy cycles in pea axillary buds. *Plant Mol. Biol.* 29, 255–265. doi: 10.1007/BF00043650

Dierck, R., De Keyser, E., De Riek, J., Dhooghe, E., Van Huylenbroeck, J., Prinsen, E., et al. (2016). Change in Auxin and Cytokinin Levels Coincides with Altered Expression of Branching Genes during Axillary Bud Outgrowth in Chrysanthemum. *PLoS One* 11:e0161732. doi: 10.1371/journal.pone.0161732

Djennane, S., Hibrand-Saint Oyant, L., Kawamura, K., Lalanne, D., Laffaire, M., Thouroude, T., et al. (2014). Impacts of light and temperature on shoot branching gradient and expression of strigolactone synthesis and signalling genes in rose: light and temperature effects on rose branching. *Plant Cell Environ.* 37, 742–757. doi: 10.1111/pce.12191

Dodsworth, S. (2009). A diverse and intricate signalling network regulates stem cell fate in the shoot apical meristem. *Dev. Biol.* 336, 1–9. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.09.031

Domagalska, M. A., and Leyser, O. (2011). Signal integration in the control of shoot branching. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 211–221. doi: 10.1038/nrm3088

Dong, F., Wang, C., Dong, Y., Hao, S., Wang, L., Sun, X., et al. (2020). Differential expression of microRNAs in tomato leaves treated with different light qualities. *BMC Genomics* 21:37. doi: 10.1186/s12864-019-6440-4

Du, Y., Liu, L., Li, M., Fang, S., Shen, X., Chu, J., et al. (2017). UNBRANCHED3 regulates branching by modulating cytokinin biosynthesis and signaling in maize and rice. *New Phytol.* 214, 721–733. doi: 10.1111/nph.14391

Dun, E. A., de Saint Germain, A., Rameau, C., and Beveridge, C. A. (2012). Antagonistic Action of Strigolactone and Cytokinin in Bud Outgrowth Control. *Plant Physiol.* 158, 487–498. doi: 10.1104/pp.111.186783

Dun, E. A., Ferguson, B. J., and Beveridge, C. A. (2006). Apical Dominance and Shoot Branching. Divergent Opinions or Divergent Mechanisms? *Plant Physiol.* 142, 812–819. doi: 10.1104/pp.106.086868

Fahlgren, N., Howell, M. D., Kasschau, K. D., Chapman, E. J., Sullivan, C. M., Cumbie, J. S., et al. (2007). High-Throughput Sequencing of *Arabidopsis* microRNAs: evidence for Frequent Birth and Death of MIRNA Genes. *PLoS One* 2:e219. doi: 10.1371/journal.pone.0000219

Ferguson, B. J., and Beveridge, C. A. (2009). Roles for Auxin, Cytokinin, and Strigolactone in Regulating Shoot Branching. *Plant Physiol.* 149, 1929–1944. doi: 10.1104/pp.109.135475

Finlayson, S. A., Krishnareddy, S. R., Kebrom, T. H., and Casal, J. J. (2010). Phytochrome Regulation of Branching in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 152, 1914–1927. doi: 10.1104/pp.109.148833

Garbez, M., Galopin, G., Sigogne, M., Favre, P., Demotes-Mainard, S., and Symoneaux, R. (2015). Assessing the visual aspect of rotating virtual rose bushes by a labeled sorting task. *Food Qual. Prefer.* 40, 287–295. doi: 10.1016/j.foodqual.2014.06.008

Girault, T., Abidi, F., Sigogne, M., Pelleschi-Travier, S., Boumaza, R., Sakr, S., et al. (2010). Sugars are under light control during bud burst in Rosa sp.: photocontrol of sugars during bud burst. *Plant Cell Environ.* 33, 1339–1350. doi: 10.1111/j.1365-3040.2010.02152.x

Girault, T., Bergougnoux, V., Combes, D., Viemont, J.-D., and Leduc, N. (2008). Light controls shoot meristem organogenic activity and leaf primordia growth during bud burst in *Rosa* sp. *Plant Cell Environ.* 31, 1534–1544. doi: 10.1111/j.1365-3040.2008.01856.x

Gocal, G. F. W., Pharis, R. P., Yeung, E. C., and Pearce, D. (1991). Changes after Decapitation in Concentrations of Indole-3-Acetic Acid and Abscisic Acid in the Larger Axillary Bud of *Phaseolus vulgaris* L. cv Tender Green. *Plant Physiol.* 95, 344–350. doi: 10.1104/pp.95.2.344

González-Grandío, E., Poza-Carrión, C., Sorzano, C. O. S., and Cubas, P. (2013). BRANCHED1 Promotes Axillary Bud Dormancy in Response to Shade in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25, 834–850. doi: 10.1105/tpc.112.108480

Guo, C., Xu, Y., Shi, M., Lai, Y., Wu, X., Wang, H., et al. (2017). Repression of miR156 by miR159 Regulates the Timing of the Juvenile-to-Adult Transition in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 29, 1293–1304. doi: 10.1105/tpc.16.00975

Guo, S., Xu, Y., Liu, H., Mao, Z., Zhang, C., Ma, Y., et al. (2013). The interaction between OsMADS57 and OsTB1 modulates rice tillering via DWARF14. *Nat. Commun.* 4:1566. doi: 10.1038/ncomms2542

Han, H., Yan, A., Li, L., Zhu, Y., Feng, B., Liu, X., et al. (2020). A signal cascade originated from epidermis defines apical-basal patterning of *Arabidopsis* shoot apical meristems. *Nat. Commun.* 11:1214. doi: 10.1038/s41467-020-14989-4

Henry, C., Rabot, A., Laloi, M., Mortreau, E., Sigogne, M., Leduc, N., et al. (2011). Regulation of RhSUC2, a sucrose transporter, is correlated with the light control of bud burst in Rosa sp.: sucrose transporter role in bud burst. *Plant Cell Environ.* 34, 1776–1789. doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02374.x

Hibrand Saint-Oyant, L., Ruttink, T., Hamama, L., Kirov, I., Lakhwani, D., Zhou, N. N., et al. (2018). A high-quality genome sequence of Rosa chinensis to elucidate ornamental traits. *Nat. Plants* 4, 473–484. doi: 10.1038/s41477-018-0166-1

Holalu, S. V., Reddy, S. K., Blackman, B. K., and Finlayson, S. A. (2020). Phytochrome interacting factors 4 and 5 regulate axillary branching via bud abscisic acid and stem auxin signalling. *Plant Cell Environ.* 43, 2224–2238. doi: 10.1111/pce.13824

Hu, G., Hao, M., Wang, L., Liu, J., Zhang, Z., Tang, Y., et al. (2020). The Cotton miR477- *CBP60A* Module Participates in Plant Defense Against *Verticillium dahlia*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 33, 624–636. doi: 10.1094/MPMI-10-19-0302-R

Huang, J., Li, Z., and Zhao, D. (2016). Deregulation of the OsmiR160 Target Gene OsARF18 Causes Growth and Developmental Defects with an Alteration of Auxin Signaling in Rice. *Sci. Rep.* 6:29938. doi: 10.1038/srep29938

Huang, W., Peng, S., Xian, Z., Lin, D., Hu, G., Yang, L., et al. (2017). Overexpression of a tomato miR171 target gene *SlGRAS24* impacts multiple agronomical traits via regulating gibberellin and auxin homeostasis. *Plant Biotechnol. J.* 15, 472–488. doi: 10.1111/pbi.12646

Huché-Thélier, L., Crespel, L., Gourrierec, J. L., Morel, P., Sakr, S., and Leduc, N. (2016). Light signaling and plant responses to blue and UV radiations—Perspectives for applications in horticulture. *Environ. Exp. Bot.* 121, 22–38. doi: 10.1016/j.envexpbot.2015.06.009

Jiao, Y., Wang, Y., Xue, D., Wang, J., Yan, M., Liu, G., et al. (2010). Regulation of OsSPL14 by OsmiR156 defines ideal plant architecture in rice. *Nat. Genet.* 42, 541–544. doi: 10.1038/ng.591

Kamthan, A., Chaudhuri, A., Kamthan, M., and Datta, A. (2015). Small RNAs in plants: recent development and application for crop improvement. *Front. Plant Sci.* 06:208. doi: 10.3389/fpls.2015.00208

Kebrom, T. H., and Mullet, J. E. (2016). Transcriptome Profiling of Tiller Buds Provides New Insights into PhyB Regulation of Tillering and Indeterminate Growth in Sorghum. *Plant Physiol.* 170, 2232–2250. doi: 10.1104/pp.16.00014

Kebrom, T. H., Chandler, P. M., Swain, S. M., King, R. W., Richards, R. A., and Spielmeyer, W. (2012). Inhibition of Tiller Bud Outgrowth in the *tin* Mutant of Wheat Is Associated with Precocious Internode Development. *Plant Physiol.* 160, 308–318. doi: 10.1104/pp.112.197954

Knox, J. P., and Wareing, P. F. (1984). Apical Dominance in *Phaseolus vulgaris* L.: the Possible Roles of Abscisic and Indole-3-Acetic Acid. *J. Exp. Bot.* 35, 239–244.

Koornneef, M., and van der Veen, J. H. (1980). Induction and Analysis of gibberellin Sensitive Mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Theor. Appl. Genet.* 58, 257–263.

Kotov, A. A., Kotova, L. M., and Romanov, G. A. (2021). Signaling network regulating plant branching: recent advances and new challenges. *Plant Sci.* 307:110880. doi: 10.1016/j.plantsci.2021.110880

Kozomara, A., Birgaoanu, M., and Griffiths-Jones, S. (2019). miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* 47, D155–D162. doi: 10.1093/nar/gky1141

Kravchik, M., Stav, R., Belausov, E., and Arazi, T. (2019). Functional Characterization of microRNA171 Family in Tomato. *Plants* 8:10. doi: 10.3390/plants8010010

Lang, G., Early, J., Martin, G., and Darnell, R. (1987). Endo-, para-, and ecodormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. *HortScience* 22, 371–377.

Laufs, P., Peaucelle, A., Morin, H., and Traas, J. (2004). MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in *Arabidopsis* meristems. *Development* 131, 4311–4322. doi: 10.1242/dev.01320

Lauressergues, D., Couzigou, J.-M., Clemente, H. S., Martinez, Y., Dunand, C., Bécard, G., et al. (2015). Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides. *Nature* 520, 90–93. doi: 10.1038/nature14346

Le Bris, M., Michaux-Ferrière, N., Jacob, Y., Poupet, A., Barthe, P., Guigonis, J.-M., et al. (1999). Regulation of bud dormancy by manipulation of ABA in isolated buds of *Rosa hybrida* cultured in vitro. *Funct. Plant Biol.* 26, 273–281. doi: 10.1071/PP98133

Le Hir, R., Leduc, N., Jeannette, E., Viemont, J.-D., and Pelleschi-Travier, S. (2006). Variations in sucrose and ABA concentrations are concomitant with heteroblastic leaf shape changes in a rhythmically growing species (*Quercus robur*). *Tree Physiol.* 26, 229–238. doi: 10.1093/treephys/26.2.229

Le Moigne, M.-A., Guérin, V., Furet, P.-M., Billard, V., Lebrec, A., Spíchal, L., et al. (2018). Asparagine and sugars are both required to sustain secondary axis elongation after bud outgrowth in *Rosa hybrida*. *J. Plant Physiol.* 222, 17–27. doi: 10.1016/j.jplph.2017.12.013

Leduc, N., Roman, H., Barbier, F., Péron, T., Huché-Thélier, L., Lothier, J., et al. (2014). Light Signaling in Bud Outgrowth and Branching in Plants. *Plants* 3, 223–250. doi: 10.3390/plants3020223

Li, C., and Zhang, B. (2016). MicroRNAs in Control of Plant Development. *J. Cell. Physiol.* 231, 303–313. doi: 10.1002/jcp.25125

Li, G., Tan, M., Cheng, F., Liu, X., Qi, S., Chen, H., et al. (2018). Molecular role of cytokinin in bud activation and outgrowth in apple branching based on transcriptomic analysis. *Plant Mol. Biol.* 98, 261–274. doi: 10.1007/s11103-018-0781-2

Li, X., Xia, K., Liang, Z., Chen, K., Gao, C., and Zhang, M. (2016). MicroRNA393 is involved in nitrogen-promoted rice tillering through regulation of auxin signal transduction in axillary buds. *Sci. Rep.* 6:32158. doi: 10.1038/srep32158

Lian, H., Wang, L., Ma, N., Zhou, C.-M., Han, L., Zhang, T.-Q., et al. (2021). Redundant and specific roles of individual MIR172 genes in plant development. *PLoS Biol.* 19:e3001044. doi: 10.1371/journal.pbio.3001044

Li-Marchetti, C., Le Bras, C., Relion, D., Citerne, S., Huché-Thélier, L., Sakr, S., et al. (2015). Genotypic differences in architectural and physiological responses to water restriction in rose bush. *Front. Plant Sci.* 06:355. doi: 10.3389/fpls.2015.00355

Liu, H., Yu, H., Tang, G., and Huang, T. (2018). Small but powerful: function of microRNAs in plant development. *Plant Cell Rep.* 37, 515–528. doi: 10.1007/s00299-017-2246-5

Liu, S., Mi, X., Zhang, R., An, Y., Zhou, Q., Yang, T., et al. (2019). Integrated analysis of miRNAs and their targets reveals that miR319c/TCP2 regulates apical bud burst in tea plant (*Camellia sinensis*). *Planta* 250, 1111–1129. doi: 10.1007/s00425-019-03207-1

Lu, Z., Yu, H., Xiong, G., Wang, J., Jiao, Y., Liu, G., et al. (2013). Genome-Wide Binding Analysis of the Transcription Activator IDEAL PLANT ARCHITECTURE1 Reveals a Complex Network Regulating Rice Plant Architecture. *Plant Cell* 25, 3743–3759. doi: 10.1105/tpc.113.113639

Marquat, C., Vandamme, M., Gendraud, M., and Pétel, G. (1999). Dormancy in vegetative buds of peach: relation between carbohydrate absorption potentials and carbohydrate concentration in the bud during dormancy and its release. *Sci. Hortic.* 79, 151–162. doi: 10.1016/S0304-4238(98)00203-9

Mason, M. G., Ross, J. J., Babst, B. A., Wienclaw, B. N., and Beveridge, C. A. (2014). Sugar demand, not auxin, is the initial regulator of apical dominance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 6092–6097. doi: 10.1073/pnas.1322045111

Maugarny-Calès, A., and Laufs, P. (2018). Getting leaves into shape: a molecular, cellular, environmental and evolutionary view. *Development* 145:dev161646. doi: 10.1242/dev.161646

Meitha, K., Agudelo-Romero, P., Signorelli, S., Gibbs, D. J., Considine, J. A., Foyer, C. H., et al. (2018). Developmental control of hypoxia during bud burst in grapevine: developmental hypoxia in grapevine buds. *Plant Cell Environ.* 41, 1154–1170. doi: 10.1111/pce.13141

Miura, K., Ikeda, M., Matsubara, A., Song, X.-J., Ito, M., Asano, K., et al. (2010). OsSPL14 promotes panicle branching and higher grain productivity in rice. *Nat. Genet.* 42, 545–549. doi: 10.1038/ng.592

Morea, E. G. O., da Silva, E. M., e Silva, G. F. F., Valente, G. T., Barrera Rojas, C. H., Vincentz, M., et al. (2016). Functional and evolutionary analyses of the miR156 and miR529 families in land plants. *BMC Plant Biol.* 16:40. doi: 10.1186/s12870-016-0716-5

Ophir, R., Pang, X., Halaly, T., Venkateswari, J., Lavee, S., Galbraith, D., et al. (2009). Gene-expression profiling of grape bud response to two alternative dormancy-release stimuli expose possible links between impaired mitochondrial activity, hypoxia, ethylene-ABA interplay and cell enlargement. *Plant Mol. Biol.* 71, 403–423. doi: 10.1007/s11103-009-9531-9

Or, E., Vilozny, I., Fennell, A., Eyal, Y., and Ogrodovitch, A. (2002). Dormancy in grape buds: isolation and characterization of catalase cDNA and analysis of its expression following chemical induction of bud dormancy release. *Plant Sci.* 162, 121–130. doi: 10.1016/S0168-9452(01)00542-8

Ortiz-Morea, F. A., Vicentini, R., Silva, G. F. F., Silva, E. M., Carrer, H., Rodrigues, A. P., et al. (2013). Global analysis of the sugarcane microtranscriptome reveals a unique composition of small RNAs associated with axillary bud outgrowth. *J. Exp. Bot.* 64, 2307–2320. doi: 10.1093/jxb/ert089

Palatnik, J. F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J. C., et al. (2003). Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* 425, 257–263. doi: 10.1038/nature01958

Park, S. J., Choi, S. W., Kim, G. M., Møller, C., Pai, H.-S., and Yang, S. W. (2021). Light-stabilized FHA2 suppresses miRNA biogenesis through interactions with DCL1 and HYL1. *Mol. Plant* 14, 647–663. doi: 10.1016/j.molp.2021.01.020

Pashkovskiy, P. P., Kartashov, A. V., Zlobin, I. E., Pogosyan, S. I., and Kuznetsov, V. V. (2016). Blue light alters miR167 expression and microRNA-targeted auxin response factor genes in *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant Physiol. Biochem.* 104, 146–154. doi: 10.1016/j.plaphy.2016.03.018

Pashkovskiy, P., Ryazansky, S., Kartashov, A., Voloshin, R., Khudyakova, A., Kosobryukhov, A. A., et al. (2021). Effect of red light on photosynthetic acclimation and the gene expression of certain light signalling components involved in the microRNA biogenesis in the extremophile Eutrema salsugineum. *J. Biotechnol.* 325, 35–42. doi: 10.1016/j.jbiotec.2020.11.018

Pérez, V. I., Van Remmen, H., Bokov, A., Epstein, C. J., Vijg, J., and Richardson, A. (2009). The overexpression of major antioxidant enzymes does not extend the lifespan of mice. *Aging Cell* 8, 73–75. doi: 10.1111/j.1474-9726.2008.00449.x

Porcher, A., Guérin, V., Leduc, N., Lebrec, A., Lothier, J., and Vian, A. (2021). Ascorbate–glutathione pathways mediated by cytokinin regulate H2O2 levels in light-controlled rose bud burst. *Plant Physiol.* 186, 910–928. doi: 10.1093/plphys/kiab123

Porcher, A., Guérin, V., Montrichard, F., Lebrec, A., Lothier, J., and Vian, A. (2020). Ascorbate glutathione-dependent H2O2 scavenging is an important process in axillary bud outgrowth in rosebush. *Ann. Bot.* 126, 1049–1062. doi: 10.1093/aob/mcaa130

Preston, J. C., and Hileman, L. C. (2013). Functional Evolution in the Plant SQUAMOSA-PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) Gene Family. *Front. Plant Sci.* 4:80. doi: 10.3389/fpls.2013.00080

Prusinkiewicz, P., Crawford, S., Smith, R. S., Ljung, K., Bennett, T., Ongaro, V., et al. (2009). Control of bud activation by an auxin transport switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 17431–17436. doi: 10.1073/pnas.0906696106

Pulido, A., and Laufs, P. (2010). Co-ordination of developmental processes by small RNAs during leaf development. *J. Exp. Bot.* 61, 1277–1291. doi: 10.1093/jxb/erp397

Qiao, Y., Zhang, J., Zhang, J., Wang, Z., Ran, A., Guo, H., et al. (2017). Integrated RNA-seq and sRNA-seq analysis reveals miRNA effects on secondary metabolism in *Solanum tuberosum* L. *Mol. Genet. Genomics* 292, 37–52. doi: 10.1007/s00438-016-1253-5

Rabot, A., Henry, C., Ben Baaziz, K., Mortreau, E., Azri, W., Lothier, J., et al. (2012). Insight into the Role of Sugars in Bud Burst Under Light in the Rose. *Plant Cell Physiol.* 53, 1068–1082. doi: 10.1093/pcp/pcs051

Rabot, A., Portemer, V., Péron, T., Mortreau, E., Leduc, N., Hamama, L., et al. (2014). Interplay of Sugar, Light and Gibberellins in Expression of *Rosa hybrida* Vacuolar Invertase 1 Regulation. *Plant Cell Physiol.* 55, 1734–1748. doi: 10.1093/pcp/pcu106

Rajagopalan, R., Vaucheret, H., Trejo, J., and Bartel, D. P. (2006). A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* 20, 3407–3425. doi: 10.1101/gad.1476406

Rameau, C., Bertheloot, J., Leduc, N., Andrieu, B., Foucher, F., and Sakr, S. (2015). Multiple pathways regulate shoot branching. *Front. Plant Sci.* 5:741. doi: 10.3389/fpls.2014.00741

Raymond, O., Gouzy, J., Just, J., Badouin, H., Verdenaud, M., Lemainque, A., et al. (2018). The Rosa genome provides new insights into the domestication of modern roses. *Nat. Genet.* 50, 772–777. doi: 10.1038/s41588-018-0110-3

Reyes, J. L., and Chua, N.-H. (2007). ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during *Arabidopsis* seed germination: miR159 regulation of ABA responses during germination. *Plant J.* 49, 592–606. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02980.x

Roman, H., Girault, T., Barbier, F., Péron, T., Brouard, N., Pìnčík, A., et al. (2016). Cytokinins Are Initial Targets of Light in the Control of Bud Outgrowth. *Plant Physiol.* 172, 489–509. doi: 10.1104/pp.16.00530

Roman, H., Girault, T., Le Gourrierec, J., and Leduc, N. (2017). *In silico* analysis of 3 expansin gene promoters reveals 2 hubs controlling light and cytokinins response during bud outgrowth. *Plant Signal. Behav.* 12:e1284725. doi: 10.1080/15592324.2017.1284725

Romanowski, A., Furniss, J. J., Hussain, E., and Halliday, K. J. (2021). Phytochrome regulates cellular response plasticity and the basic molecular machinery of leaf development. *Plant Physiol.* 186, 1220–1239. doi: 10.1093/plphys/kiab112

Sagi, M., Davydov, O., Orazova, S., Yesbergenova, Z., Ophir, R., Stratmann, J. W., et al. (2004). Plant Respiratory Burst Oxidase Homologs Impinge on Wound Responsiveness and Development in *Lycopersicon esculentum* [W]. *Plant Cell* 16, 616–628. doi: 10.1105/tpc.019398

Sánchez-Retuerta, C., Suaréz-López, P., and Henriques, R. (2018). Under a New Light: regulation of Light-Dependent Pathways by Non-coding RNAs. *Front. Plant Sci.* 9:962. doi: 10.3389/fpls.2018.00962

Schneider, A., Godin, C., Boudon, F., Demotes-Mainard, S., Sakr, S., and Bertheloot, J. (2019). Light Regulation of Axillary Bud Outgrowth Along Plant Axes: an Overview of the Roles of Sugars and Hormones. *Front. Plant Sci.* 10:1296. doi: 10.3389/fpls.2019.01296

Schulze, S., Schäfer, B. N., Parizotto, E. A., Voinnet, O., and Theres, K. (2010). LOST MERISTEMS genes regulate cell differentiation of central zone

descendants in *Arabidopsis* shoot meristems: LOM genes control meristem maintenance. *Plant J.* 64, 668–678. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04359.x

Shimizu, S., and Mori, H. (1998). Analysis of Cycles of Dormancy and Growth in Pea Axillary Buds Based on mRNA Accumulation Patterns of Cell Cycle-Related Genes. *Plant Cell Physiol.* 39, 255–262. doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a029365

Singh, A., Singh, S., Panigrahi, K. C. S., Reski, R., and Sarkar, A. K. (2014). Balanced activity of microRNA166/165 and its target transcripts from the class III homeodomain-leucine zipper family regulates root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.* 33, 945–953. doi: 10.1007/s00299-014-1573-z

Sudawan, B., Chang, C.-S., Chao, H., Ku, M. S. B., and Yen, Y. (2016). Hydrogen cyanamide breaks grapevine bud dormancy in the summer through transient activation of gene expression and accumulation of reactive oxygen and nitrogen species. *BMC Plant Biol.* 16:202. doi: 10.1186/s12870-016-0889-y

Sun, W., Xu, X. H., Wu, X., Wang, Y., Lu, X., Sun, H., et al. (2015). Genome-wide identification of microRNAs and their targets in wild type and phyB mutant provides a key link between microRNAs and the phyB-mediated light signaling pathway in rice. *Front. Plant Sci.* 6:372. doi: 10.3389/fpls.2015.00372

Sun, Z., Li, M., Zhou, Y., Guo, T., Liu, Y., Zhang, H., et al. (2018). Coordinated regulation of *Arabidopsis* microRNA biogenesis and red light signaling through Dicer-like 1 and phytochrome-interacting factor 4. *PLoS Genet.* 14:e1007247. doi: 10.1371/journal.pgen.1007247

Sun, Z., Su, C., Yun, J., Jiang, Q., Wang, L., Wang, Y., et al. (2019). Genetic improvement of the shoot architecture and yield in soya bean plants via the manipulation of *GmmiR156b*. *Plant Biotechnol. J.* 17, 50–62. doi: 10.1111/pbi.12946

Sunkar, R., Girke, T., Jain, P. K., and Zhu, J.-K. (2005). Cloning and Characterization of MicroRNAs from Rice. *Plant Cell* 17, 1397–1411. doi: 10.1105/tpc.105.031682

Sussex, I. M., and Kerk, N. M. (2001). The evolution of plant architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 33–37. doi: 10.1016/S1369-5266(00)00132-1

Suttle, J. C. (2009). Ethylene Is Not Involved in Hormone- and Bromoethane-Induced Dormancy Break in Russet Burbank Minitubers. *Am. J. Potato Res.* 86, 278–285. doi: 10.1007/s12230-009-9081-3

Tang, X., Bian, S., Tang, M., Lu, Q., Li, S., Liu, X., et al. (2012). MicroRNA–Mediated Repression of the Seed Maturation Program during Vegetative Development in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* 8:e1003091. doi: 10.1371/journal.pgen.1003091

Tian, C., Zhang, X., He, J., Yu, H., Wang, Y., Shi, B., et al. (2014). An organ boundary-enriched gene regulatory network uncovers regulatory hierarchies underlying axillary meristem initiation. *Mol. Syst. Biol.* 10:755. doi: 10.15252/msb.20145470

Tian, L., Liu, H., Ren, L., Ku, L., Wu, L., Li, M., et al. (2018). MicroRNA 399 as a potential integrator of photo-response, phosphate homeostasis, and sucrose signaling under long day condition. *BMC Plant Biol* 18:290. doi: 10.1186/s12870-018-1460-9

Tucker, D. J. (1976). ENDOGENOUS GROWTH REGULATORS IN RELATION TO SIDE SHOOT DEVELOPMENT IN THE TOMATO. *New Phytol.* 77, 561–568. doi: 10.1111/j.1469-8137.1976.tb04647.x

Vanneste, S., and Friml, J. (2009). Auxin: a Trigger for Change in Plant Development. *Cell* 136, 1005–1016. doi: 10.1016/j.cell.2009.03.001

Vergara, R., Parada, F., Rubio, S., and Pérez, F. J. (2012). Hypoxia induces H2O2 production and activates antioxidant defence system in grapevine buds through mediation of H2O2 and ethylene. *J. Exp. Bot.* 63, 4123–4131.

Voinnet, O. (2009). Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. *Cell* 136, 669–687. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.046

Walton, E. F., Wu, R.-M., Richardson, A. C., Davy, M., Hellens, R. P., Thodey, K., et al. (2009). A rapid transcriptional activation is induced by the dormancy-breaking chemical hydrogen cyanamide in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) buds. *J. Exp. Bot.* 60, 3835–3848. doi: 10.1093/jxb/erp231

Wang, C.-Y., Chen, Y.-Q., and Liu, Q. (2011). Sculpting the meristem: the roles of miRNAs in plant stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409, 363–366. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.04.123

Wang, H., and Wang, H. (2015). The miR156/SPL Module, a Regulatory Hub and Versatile Toolbox, Gears up Crops for Enhanced Agronomic Traits. *Mol. Plant* 8, 677–688. doi: 10.1016/j.molp.2015.01.008

Wang, J.-W., Czech, B., and Weigel, D. (2009). miR156-Regulated SPL Transcription Factors Define an Endogenous Flowering Pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 138, 738–749. doi: 10.1016/j.cell.2009.06.014

Wang, L., Mai, Y.-X., Zhang, Y.-C., Luo, Q., and Yang, H.-Q. (2010). MicroRNA171c-Targeted SCL6-II, SCL6-III, and SCL6-IV Genes Regulate Shoot Branching in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* 3, 794–806. doi: 10.1093/mp/ssq042

Wang, L., Sun, S., Jin, J., Fu, D., Yang, X., Weng, X., et al. (2015). Coordinated regulation of vegetative and reproductive branching in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 15504–15509. doi: 10.1073/pnas.1521949112

Wang, M., Le Moigne, M.-A., Bertheloot, J., Crespel, L., Perez-Garcia, M.-D., Ogé, L., et al. (2019a). BRANCHED1: a Key Hub of Shoot Branching. *Front. Plant Sci.* 10:76. doi: 10.3389/fpls.2019.00076

Wang, M., Ogé, L., Voisine, L., Perez-Garcia, M.-D., Jeauffre, J., Hibrand Saint-Oyant, L., et al. (2019b). Posttranscriptional Regulation of RhBRC1 (*Rosa hybrida* BRANCHED1) in Response to Sugars is Mediated via its Own 3′ Untranslated Region, with a Potential Role of RhPUF4 (Pumilio RNA-Binding Protein Family). *Int. J. Mol. Sci.* 20:3808. doi: 10.3390/ijms20153808

Wang, M., Pérez-Garcia, M.-D., Davière, J.-M., Barbier, F., Ogé, L., Gentilhomme, J., et al. (2021). Outgrowth of the axillary bud in rose is controlled by sugar metabolism and signalling. *J. Exp. Bot.* 72, 3044–3060. doi: 10.1093/jxb/erab046

Wang, M., Zang, L., Jiao, F., Perez-Garcia, M.-D., Ogé, L., Hamama, L., et al. (2020). Sugar Signaling and Post-transcriptional Regulation in Plants: an Overlooked or an Emerging Topic? *Front. Plant Sci.* 11:578096. doi: 10.3389/fpls.2020.578096

Wang, R., Yang, X., Guo, S., Wang, Z., Zhang, Z., and Fang, Z. (2021). MiR319-targeted *OsTCP21* and *OsGAmyb* regulate tillering and grain yield in rice. *J. Integr. Plant Biol.* 63, 1260–1272. doi: 10.1111/jipb.13097

Wang, S., Liu, S., Liu, L., Li, R., Guo, R., Xia, X., et al. (2020). miR477 targets the phenylalanine ammonia-lyase gene and enhances the susceptibility of the tea plant (*Camellia sinensis*) to disease during Pseudopestalotiopsis species infection. *Planta* 251:59. doi: 10.1007/s00425-020-03353-x

Wang, Y., Wang, Z., Amyot, L., Tian, L., Xu, Z., Gruber, M. Y., et al. (2015). Ectopic expression of miR156 represses nodulation and causes morphological and developmental changes in *Lotus japonicus*. *Mol. Genet. Genomics* 290, 471–484. doi: 10.1007/s00438-014-0931-4

Weber, M. J. (2004). New human and mouse microRNA genes found by homology search: new human and mouse microRNA gene. *FEBS J.* 272, 59–73. doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04389.x

Wei, S., Gruber, M. Y., Yu, B., Gao, M.-J., Khachatourians, G. G., Hegedus, D. D., et al. (2012). *Arabidopsis* mutant sk156 reveals complex regulation of SPL15 in a miR156-controlled gene network. *BMC Plant Biol.* 12:169. doi: 10.1186/1471-2229-12-169

Wei, S., Yu, B., Gruber, M. Y., Khachatourians, G. G., Hegedus, D. D., and Hannoufa, A. (2010). Enhanced Seed Carotenoid Levels and Branching in Transgenic *Brassica napus* Expressing the *Arabidopsis miR156b* Gene. *J. Agric. Food Chem.* 58, 9572–9578. doi: 10.1021/jf102635f

Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855–862. doi: 10.1016/0092-8674(93)90530-4

Wu, G. (2013). Plant MicroRNAs and Development. *J. Genet. Genomics* 40, 217–230. doi: 10.1016/j.jgg.2013.04.002

Xia, K., Wang, R., Ou, X., Fang, Z., Tian, C., Duan, J., et al. (2012). OsTIR1 and OsAFB2 Downregulation via OsmiR393 Overexpression Leads to More Tillers, Early Flowering and Less Tolerance to Salt and Drought in Rice. *PLoS One* 7:e30039. doi: 10.1371/journal.pone.0030039

Xie, Y., Liu, Y., Wang, H., Ma, X., Wang, B., Wu, G., et al. (2017). Phytochrome-interacting factors directly suppress MIR156 expression to enhance shade-avoidance syndrome in *Arabidopsis*. *Nat. Commun.* 8:348. doi: 10.1038/s41467-017-00404-y

Xu, M., Hu, T., Zhao, J., Park, M.-Y., Earley, K. W., Wu, G., et al. (2016). Developmental Functions of miR156-Regulated SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) Genes in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* 12:e1006263. doi: 10.1371/journal.pgen.1006263

Yan, Y., Wei, M., Li, Y., Tao, H., Wu, H., Chen, Z., et al. (2021). MiR529a controls plant height, tiller number, panicle architecture and grain size by regulating SPL target genes in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci.* 302:110728. doi: 10.1016/j.plantsci.2020.110728

Yang, T., Wang, Y., Teotia, S., Zhang, Z., and Tang, G. (2018). The Making of Leaves: how Small RNA Networks Modulate Leaf Development. *Front. Plant Sci.* 9:824. doi: 10.3389/fpls.2018.00824

Yue, E., Li, C., Li, Y., Liu, Z., and Xu, J.-H. (2017). MiR529a modulates panicle architecture through regulating SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE genes in rice (*Oryza sativa*). *Plant Mol. Biol.* 94, 469–480. doi: 10.1007/s11103-017-0618-4

Zhan, J., Chu, Y., Wang, Y., Diao, Y., Zhao, Y., Liu, L., et al. (2021). The miR164-GhCUC2-GhBRC1 module regulates plant architecture through abscisic acid in cotton. *Plant Biotechnol. J.* 19, 1839–1851. doi: 10.1111/pbi.13599

Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., and Anderson, T. A. (2006). Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact. *Dev. Biol.* 289, 3–16. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.10.036

Zhang, H., He, H., Wang, X., Wang, X., Yang, X., Li, L., et al. (2011). Genome-wide mapping of the HY5-mediated genenetworks in *Arabidopsis* that involve both transcriptional and post-transcriptional regulation: regulation of HY5-mediated gene networks. *Plant J.* 65, 346–358. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04426.x

Zhang, Y.-C., Yu, Y., Wang, C.-Y., Li, Z.-Y., Liu, Q., Xu, J., et al. (2013). Overexpression of microRNA OsmiR397 improves rice yield by increasing grain size and promoting panicle branching. *Nat. Biotechnol.* 31, 848–852. doi: 10.1038/nbt.2646

Zhang, Z., and Zhang, X. (2012). Argonautes compete for miR165/166 to regulate shoot apical meristem development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 652–658. doi: 10.1016/j.pbi.2012.05.007

Zhao, J. P., Jiang, X. L., Zhang, B. Y., and Su, X. H. (2012). Involvement of microRNA-mediated gene expression regulation in the pathological development of stem canker disease in *Populus trichocarpa*. *PLoS One* 7:e44968. doi: 10.1371/journal.pone.0044968

Zhao, Q., Nakashima, J., Chen, F., Yin, Y., Fu, C., Yun, J., et al. (2013). LACCASE Is Necessary and Nonredundant with *Peroxidase* for Lignin Polymerization during Vascular Development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25, 3976–3987. doi: 10.1105/tpc.113.117770

Zhao, Y., Wen, H., Teotia, S., Du, Y., Zhang, J., Li, J., et al. (2017). Suppression of microRNA159 impacts multiple agronomic traits in rice (*Oryza sativa* L.). *BMC Plant Biol.* 17:215. doi: 10.1186/s12870-017-1171-7

Zhou, B., Fan, P., Li, Y., Yan, H., and Xu, Q. (2016). Exploring miRNAs involved in blue/UV-A light response in Brassica rapa reveals special regulatory mode during seedling development. *BMC Plant Biol.* 16:111. doi: 10.1186/s12870-016-0799-z

Zhou, M., Li, D., Li, Z., Hu, Q., Yang, C., Zhu, L., et al. (2013). Constitutive Expression of a *miR319* Gene Alters Plant Development and Enhances Salt and Drought Tolerance in Transgenic Creeping Bentgrass. *Plant Physiol.* 161, 1375–1391. doi: 10.1104/pp.112.208702

Zhou, Y., Yan, A., Han, H., Li, T., Geng, Y., Liu, X., et al. (2018). HAIRY MERISTEM with WUSCHEL confines CLAVATA3 expression to the outer apical meristem layers. *Science* 361, 502–506. doi: 10.1126/science.aar8638

Zhu, Y., and Wagner, D. (2020). Plant Inflorescence Architecture: the Formation, Activity, and Fate of Axillary Meristems. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 12:a034652. doi: 10.1101/cshperspect.a034652

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Mallet, Laufs, Leduc and Le Gourrierec. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

DOCTORAT ECOLOGIE BRETAGNE GEOSCIENCES LOIRE AGRONOMIE ALIMENTATION

université angers

Titre : Régulations post-transcriptionnelles par les miARNs du débourrement des bourgeons et de son photo-contrôle chez le rosier buisson *Rosa* 'Radrazz'

Mots clés : miARNs, photo-contrôle, ramification

La ramification est un déterminant majeur de l'architecture des plantes et repose notamment sur la capacité de leurs bourgeons axillaires à débourrer. Celle-ci dépend fortement des facteurs environnementaux, en particulier de la lumière. Pour étudier le photo-contrôle du débourrement, le rosier (*Rosa* 'Radrazz') a été choisi car il s'agit d'une plante ornementale qui a un besoin absolu de lumière pour déclencher son débourrement et de première importance économique. Les travaux de recherches de l'équipe visent à élucider comment la lumière régule les facteurs endogènes (hormones, nutriments (sucres, azote), espèces réactives à l'oxygène (ROS)) et leurs interactions dans le contrôle de la ramification. De nombreuses données ont été obtenues sur la régulation transcriptionnelle du débourrement des bourgeons de rosier par la lumière. A l'inverse, peu de choses sont encore connues quant à la contribution des régulations post-transcriptionnelles à ce processus. Dans cette thèse, nous avons étudié le rôle des microARNs (miARNs) qui jouent un rôle central dans les régulations post-transcriptionnelles. La régulation par un miARN implique son appariement au transcrit de gènes cibles qui aboutit à son clivage ou à l'inhibition de sa traduction. Un séquençage haut débit de petits ARNs (miARNs et siARNs (small intefering RNAs)) combiné à un séquençage des transcrits a été réalisé sur des ARNs totaux de bourgeons axillaires. L'analyse du séquençage des ARNm nous a permis d'identifier des acteurs de voies métaboliques connues (signalisation hormone, métabolisme du saccharose) mais aussi peu décrites dans la littérature (métabolisme des lipides, synthèse des flavonoïdes) qui sont impliqués dans les phases précoces de la régulation transcriptionnelle du débourrement. Les gènes cibles putatifs de chacun de ces 7 miARNs ont été prédits par une analyse bio-informatique puis une recherche de corrélation négative entre l'expression de chacun des miARNs et celle de leurs gènes cibles a été réalisée.

Ceci a mis en évidence 33 couples miRNAs/gene cibles potentiels. Les profils d'expression de certains de ces couples (miARN/gènes cibles), ont été étudiés par RT-qPCR sur une cinétique plus longue (jusqu'à 96h après décapitation). Deux couples (miR319/TCPs et miR396/GRFs) qui présentent respectivement un rôle dans la morphogénèse foliaire et la prolifération cellulaire, processus importants du débourrement, ont été étudiés. Des lignées transgéniques d'*Arabidopsis* surexprimant ces miARNs de rosier ont été produites et phénotypées. Les lignées surexpresseurs du pre-miR319 de rosier présentent une ramification réduite et une croissance retardée en comparaison avec la lignée sauvage. Au contraire, une lignée parmi les trois lignées de surexpresseurs du pre-miR396 de rosier présente une augmentation du nombre de paraclades de rosette.

En conclusion, nos analyses ont mis en évidence des familles de miARNs conservées pouvant jouer un rôle dans le contrôle du débourrement, dont deux familles (miR319 et miR396) qui présentent chez *Arabidopsis* des phénotypes constrastés de ramification. Il reste à déterminer si ces miARNs interagissent physiquement avec les gènes cibles que nous avons identifiés et s'ils jouent effectivement un rôle dans la régulation du débourrement des bourgeons et de son photo-contrôle chez le rosier. Les résultats acquis au cours de cette thèse complètent le réseau de régulations du débourrement chez le rosier et apportent de nouvelles pistes quant à l'importance des régulations post-transcriptionnelles par les miARNs dans ce processus.

Title: Post-transcriptional regulation by miRNAs of bud outgrowth and its photo-control in the rosebush *Rosa* 'Radrazz'

Keywords : miRNA, photo-control, branching

Branching is a major determinant of plant architecture and is based in particular on the ability of their axillary buds to burst. This is highly dependent on environmental factors, especially light. To study the photo-control of bud outgrowth, the rose (*Rosa* 'Radrazz') was chosen because it is an ornamental plant which absolutely needs light to trigger its outgrowth and is of primary economic importance. The team's research aims to elucidate how light regulates endogenous factors (hormones, nutrients (sugars, nitrogen), reactive oxygen species (ROS)) and their interactions in controlling branching. Many data have been obtained on the transcriptional regulation of rose bud outgrowth by light. Conversely, little is still known about the contribution of post-transcriptional regulations to this process. In this thesis, we studied the role of microRNAs (miRNAs) which play a central role in post-transcriptional regulations. Regulation by a miRNA involves its pairing with the transcript of target genes which results in its cleavage or inhibition of its translation. High-throughput sequencing of small RNAs (miRNAs and siRNAs (small interfering RNAs)) combined with transcript sequencing was performed on total RNAs from axillary buds. The buds were treated under contrasting lighting conditions 6 hours after decapitation of the stem: buds of plants placed in the dark and don't develop, buds of plants lit with white light initiating their outgrowth. The analysis of mRNA sequencing allowed us to identify actors of known metabolic pathways (hormone signaling, sucrose metabolism) but also little described in the literature (lipid metabolism, flavonoid synthesis) which are involved in the early phases transcriptional regulation of bud burst. Regarding the study of post-transcriptional regulation, a total of 7 miRNAs belonging to families conserved in plants and showing differential expression in buds placed in the dark or in the light were also identified.

The putative target genes of each of these 7 miRNAs were predicted by a bioinformatics analysis and then a search for a negative correlation between the expression of each of the miRNAs and that of their target genes was carried out. This revealed 33 potential miRNAs/gene pairs. The expression profiles of some of these pairs (miRNA/target genes) were studied by RT-qPCR over longer kinetics (up to 96 hours after decapitation). Two pairs (miR319/TCPs and miR396/GRFs) which respectively play a role in leaf morphogenesis and cell proliferation, important processes in bud outgrowth, were studied. Transgenic lines of Arabidopsis overexpressing these rose miRNAs were produced and phenotyped. Lines overexpressing rose pre-miR319 show reduced branching and delayed growth compared to the wild line. On the contrary, one line among the three lines of overexpressors of rose pre-miR396 shows an increase in the number of rosette paraclades. In conclusion, our analyzes have highlighted conserved families of miRNAs that can play a role in the control of bud outgrowth, including two families (miR319 and miR396) which present contrasting branching phenotypes in Arabidopsis. It remains to be determined whether these miRNAs physically interact with the target genes that we have identified and whether they actually play a role in the regulation of bud outgrowth and its photo-control in roses. The results obtained during this thesis complete the network of regulations of bud outgrowth in the rosebush and provide new leads as to the importance of post-transcriptional regulations by miRNAs in this process.