



HAL
open science

**ETUDE DE L'IMPLICATION DES
TRANSPORTEURS DE SUCRES DANS LE
PHOTOCONTROLE DU DEBOURREMENT CHEZ
LE ROSIER BUISSON (*Rosa hybrida* L.)**

Clémence Henry

► **To cite this version:**

Clémence Henry. ETUDE DE L'IMPLICATION DES TRANSPORTEURS DE SUCRES DANS LE PHOTOCONTROLE DU DEBOURREMENT CHEZ LE ROSIER BUISSON (*Rosa hybrida* L.). Biologie végétale. Université d'Angers, 2011. Français. NNT: . tel-00844647

HAL Id: tel-00844647

<https://theses.hal.science/tel-00844647>

Submitted on 15 Jul 2013

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

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

**ÉTUDE DE L'IMPLICATION DES TRANSPORTEURS DE
SUCRES DANS LE PHOTOCONTRÔLE DU
DÉBOURREMENT CHEZ LE ROSIER BUISSON (*Rosa
hybrida* L.)**

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire Végétale

ÉCOLE DOCTORALE VENAM

Présentée et soutenue publiquement

le : 21 juin 2011

  : l'Université d'Angers

par : **Clémence HENRY**

Devant le jury présenté ci-dessous :

Rapporteurs :

Mme Catherine RAMEAU, Directrice de Recherche, INRA de Versailles

M. Daniel WIPF, Professeur, Université de Bourgogne

Examineur :

M. Philippe VIVIN, Chargé de Recherche, INRA de Bordeaux

Directeurs de thèse :

M. Jean Daniel VI MONT, Professeur, Université d'Angers

M. Alain VIAN, Professeur, Université d'Angers

M. Soulayman SAKR, Professeur, Agrocampus Ouest Angers

Co-encadrant :

Mme Sandrine PELLESCI-TRAVIER, Maître de conférences, Université d'Angers

UMR A_462 SAGAH, UFR Sciences, 2 Bd Lavoisier, 49045 Angers cedex 01

A Jean-Daniel,

Remerciements

Ca y est, voici enfin le moment de faire un bilan d'un dur labeur d'un peu plus de trois ans qui a fini par porter ses fruits. J'ai bien cru à maintes reprises que je n'y arriverais pas (ou presque), mais si ! Je vais donc commencer par remercier tous les gens qui m'ont permis d'aller au bout de cette aventure et de la mener à bien.

Tout d'abord, je tiens à remercier chaleureusement Catherine Rameau et Daniel Wipf de me faire l'honneur de juger mon travail et d'en être les rapporteurs. Je remercie également Philippe Vivin d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je souhaite adresser toutes ma reconnaissance aux personnes qui ont participé à la direction et à l'encadrement de ma thèse.

J'adresse tout d'abord une émouvante pensée à Jean-Daniel Viémont, mon premier directeur de thèse. En premier lieu, je tiens à le remercier pour m'avoir permis d'intégrer l'UMR SAGAH et de m'avoir accordé toute sa confiance. Grâce à lui j'ai beaucoup appris, aussi bien sur la structure et le fonctionnement du bourgeon que sur la façon d'enseigner à l'université. Bien qu'il m'est apparu quelque peu distant de prime abord, Jean Daniel était une personne très accessible et à l'écoute. Nos nombreux échanges m'ont beaucoup enrichi.

Je tiens à remercier vivement Sandrine Pelleschi-Travier, mon encadrante, qui est à l'origine de mon projet de thèse et m'a choisie pour mener à bien cette tâche. Bien qu'il ait parfois été difficile de trouver des créneaux disponibles pour organiser des réunions ensemble, Sandrine m'a toujours soutenue dans mon travail et mes choix, même (et surtout) dans les moments les plus difficiles de ma thèse. Je tiens donc à la remercier pour la confiance et le soutien qu'elle m'a apporté.

Viennent maintenant mes directeurs de thèse, dont le soutien a également été très important, surtout dans les derniers moments de cette grande aventure...

Un grand merci à Soulayman Sakr, alias "chef !" (ne le répétez à personne, il n'aime pas qu'on le surnomme ainsi), mon co-directeur de thèse. Je tiens tout d'abord à le remercier de m'avoir conseillé de postuler pour le sujet de thèse déposé par Sandrine et Jean Daniel lorsque j'étais en Master Recherche dans son ancien laboratoire à Clermont-Ferrand. Merci également pour toutes les vives discussions et les nombreux échanges mails concernant la bibliographie, ainsi que pour toutes les choses que tu m'as apprises depuis que j'ai assisté à ton cours de "transport des assimilats" en Licence.

Je remercie également de tout coeur Alain Vian, mon deuxième directeur de thèse. Bien qu'il n'ait été associé que tardivement à mes travaux de thèse, il s'y est beaucoup impliqué et a toujours été présent pour répondre à mes questions et faire avancer ce dur labeur. Sa rigueur scientifique, ses réflexions pertinentes et son grand optimisme m'ont beaucoup apporté.

Je tiens également à remercier Laurence Hibrand-Saint Oyant, Maryse Laloi, Grégoire Le Provost et Phillipe Simier d'avoir accepté de participer à mon comité de suivi de thèse.

Ce travail m'a également conduit à travailler en collaboration avec Maryse Laloi, Rémi Lemoine et Benoît Porcheron de l'équipe LACCO de Poitiers. Je tiens à les remercier chaleureusement pour l'accueil et les conseils qu'ils m'ont apporté lors de mon séjour chez eux, cette collaboration fût un vrai plaisir. J'espère que nous aurons à nouveau l'occasion de travailler ensemble dans l'avenir.

Pour toute l'aide technique que vous m'avez apporté, ainsi que pour votre joie et votre bonne humeur, un grand merci les filles ! Quand je dis les filles, je parle bien sûr de notre super équipe de techniciennes : Séverine Chalain, Bénédicte Dubuc et Anita Lebrech. Merci également à Monique Sigogne pour les dosages de sucre, à Eric Mortreau pour l'hybridation *in situ* et les Q-PCR, à Michel Laffaire pour avoir pris soin de mes rosiers et à toute l'équipe technique de l'INRA pour l'aide qu'ils m'ont apporté au début de ma thèse.

Un grand merci également à tous les membres de l'UMR que je n'ai pas encore cité mais qui ont d'une manière ou d'une autre contribué à mon travail de thèse et à mon intégration dans l'équipe. Merci à Nathalie Leduc, José Gentilhomme, Vincent Guérin et tous les autres...

Un petit tiré à part pour tous les thésards avec qui j'ai partagé bureau, fous rires, coups de gueules, bonbons, chocolats et autre. Un grand merci à Tiffanie Girault, Amélie Rabot, Julien Le Gall, Farouk Abidi, Pierre Maxime Furet, Damien Afoufa-Bastien, Anna Medici et bon courage pour ceux qui n'ont pas encore soutenu.

Je remercie le ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche d'avoir financé ces travaux de thèse ainsi que ma formation de moniteur. Je remercie également l'IFR QUASAV de m'avoir décerné le prix de la meilleure présentation lors de la journée annuelle des doctorants en 2009. Ce prix m'a permis d'assister à mon premier congrès (et quel congrès !) : "Plant Biology 2010", organisé à Montréal par l'"American Society of Plant Biologists" et la "Canadian Society of Plant Physiologists".

Merci beaucoup à Jean Luc pour les parties de carrom, BBQ, tours en roller, déménagements et tous les bons moments qu'on a partagé ensemble. Merci Claire et Nico, et Brice et Christelle pour toutes les soirées sympas et les après midi shopping entre filles. Merci Thom pour toutes les soirées bouffe angevines et les séjours à Chambéry. Merci à tous mes collègues du théâtre et surtout Baptiste, de m'avoir permis de me défouler une fois sortie du travail. Merci également à tous mes amis du Lycée qui comptent beaucoup pour moi et à qui j'ai souvent pensé pour me remonter le moral, même si je ne les ai vu que très peu durant ces trois ans.

Je souhaite maintenant adresser toute ma gratitude aux membres de ma famille qui m'ont toujours encouragée, soutenue et supportée. Sans eux je n'en serais sûrement pas arrivée jusque là. Merci Papa et Maman de m'avoir toujours encouragée à aller plus loin dans mes études et de m'en avoir donné les moyens. Merci Nenette ! ma soeur adorée, tu es la meilleure des petites soeurs et je te souhaite de réussir tous les projets que tu entreprendras. Merci à mes grands parents à qui je pense très fort et qui ont toujours été fiers de moi. Merci également à tous les autres membres de ma famille, que j'ai un peu délaissés à l'autre bout de la France durant mes études mais à qui j'ai souvent pensé. Merci à mon frère de coeur, Romain, d'avoir été là quand j'en ai eu besoin et de m'avoir fait le bonheur d'être la maraîne de Léo.

Enfin, un grand merci à l'homme qui a habité mon coeur et partagé ma vie pendant ces trois ans : Gaëtan. Il m'a encouragé, soutenu, supporté et apporté tout son amour sans relâche tout au long de cette aventure. Merci...

Abréviations

5(6)CFDA : 5-(et 6)-diacétate de carboxyfluorescéine
μCi : microcurie
μg : microgramme
μL : microlitre
μM : micromolaire
μmol : micromole
μg : microgramme
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AIA : acide indole-3-acétique
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ATP : adénosine triphosphate
BET : bromure d'éthidium
BFV : bouton floral visible
Bq : becquerel
CCCP : carbonyl cyanide *m*-chloro-phenylhydrazone
CDS : coding sequence
CF : carboxyfluorescéine
CPV : couleur pétale visible
CWI : cell wall invertase
CZ : zone centrale
D : dwarf
DEPC : pyrocarbonate d'éthyle
DMSO : diméthylsulfoxyde
DNP : 2,4-dinitrophénol
DO : densité optique
dNTP : désoxyribonucléotides
DOC : deoxycholate de sodium
DST : disaccharides transporter
DTT : dithiotréitol
EDTA : acide éthylène diamine tétra acétique
EF : elongation factor
EGTA : acide éthylène glycol tétraacétique
ERD6 : early responsive to dehydration
GAPDH : glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GBq : gigabecquerel
GFP : green fluorescent protein
HPTS : acide 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonique
HXK : hexokinase
INT : inositol transporter
K_m : constante de Michaëlis
MAX : more axillary growth
mg : milligramme
mL : millilitre
mm : millimètre
mM : millimolaire

nm : nanomètre
MFS : major facilitator superfamily
MST : monosaccharide transporter
NEM : N-éthylmaléimide
OZ : organ zone
PCMBs : acide p-chloromercuriphenylsulfonique
PCR : polymerase chain reaction
pGlcT/SGB1 : plastidic glucose transporter/suppressor of G protein beta1
PLT/ PMT : polyol/monosaccharide transporter
PIN : pin-formed
PIP : plasma membrane intrinsic protein
PTE : polyoxyéthylène 10 tridecyl éther
PVP40 : polyvinylpyrrolidone 40
PZ : peripheral zone
RACE : rapid amplification of cDNA ends
RM : rib zone
RMS : ramosus
RT : reverse transcription
NAD-SDH : NAD-dependant sorbitol dehydrogenase
SnRK : sucrose non-fermenting-related kinase
STP : sugar transport protein
SUC/SUT : sucrose carrier / transporter
SUF : sucrose facilitator
SUSY : sucrose synthase
TAE : tris-acétate-EDTA
TMT : tonoplast monosaccharide transporter
UV : ultra violette
VGT : vacuolar glucose transporter
VI : vacuolar invertase
V_{max} : vitesse maximum
YNB : yeast nitrogen base

Table des matières

1	Introduction	1
2	Données Bibliographiques	4
2.1	Le rosier	4
2.1.1	Historique et classification	4
2.1.2	Enjeux économiques de la culture du rosier et attentes des producteurs	4
2.2	La qualité visuelle et l'architecture	6
2.2.1	La qualité visuelle et les préférences des consommateurs	6
2.2.2	L'architecture	6
2.3	Le bourgeon et son fonctionnement	7
2.3.1	Le bourgeon	7
2.3.2	Le fonctionnement du bourgeon	8
2.4	Les facteurs agissant sur le débourrement	9
2.4.1	Les facteurs environnementaux	9
2.4.1.1	La lumière	9
2.4.1.2	La température	10
2.4.1.3	La disponibilité en azote et en eau dans le milieu	11
2.4.2	Les facteurs endogènes à la plante	11
2.4.2.1	Les sucres	11
2.4.2.2	Les hormones	13
2.4.2.3	La disponibilité en eau	14
2.4.2.4	La composition lipidique des membranes	15
2.5	Le transport des sucres	15
2.5.1	La répartition et le transport des sucres au sein de la plante	15
2.5.2	La force puits d'un organe et la répartition des assimilats	17
2.5.3	Le déchargement et le transport des sucres dans les organes puits	17
2.5.4	Les transporteurs de sucres	19
2.5.4.1	Les transporteurs de saccharose	19
2.5.4.2	Les transporteurs de monosaccharides et de polyols	22
2.5.4.3	Les SWEET transporteurs	25
2.5.4.4	La régulation des transporteurs de sucre	27
3	Matériel et Méthodes	31
3.1	Modèles d'étude	31
3.1.1	Plante modèle et conditions de culture	31
3.1.2	Modèles expérimentaux	31
3.1.2.1	Plantes entières	31
3.1.2.2	Plantes décapitées	32
3.1.2.3	Noeuds isolés en culture <i>in vitro</i>	32
3.2	Méthodes expérimentales	32

3.2.1	Analyses morphologiques	32
3.2.2	Analyses histologiques	33
3.2.2.1	Marquage des faisceaux conducteurs et des connexions symplasmiques	33
3.2.3	Analyses biochimiques	34
3.2.3.1	Dosages de sucres	34
3.2.3.2	Absorption de sucres radio-marqués par les bourgeons	34
3.2.4	Analyses à l'échelle moléculaire	35
3.2.4.1	Extraction d'ARN et synthèse d'ADNc	35
3.2.4.2	Clonage des séquences codant pour des transporteurs de sucres	36
3.2.4.3	Analyses transcriptomiques	37
3.2.5	Validation de la fonction co-transporteur saccharose / H ⁺ de RhSUC2	38
3.2.5.1	Construction utilisée pour l'expression de <i>RhSUC2</i> en levure	39
3.2.5.2	Transformation des levures	39
3.2.5.3	Test en goutte	39
3.2.6	Analyses bioinformatiques des séquences nucléiques et protéiques	40
3.2.6.1	Recherche de séquences	40
3.2.6.2	Alignements de séquences et construction d'arbres phylogénétiques	41
3.2.6.3	Analyse de la séquence protéique prédite de RhSUC2	41
3.2.7	Analyses statistiques des résultats	41
3.2.8	Rédaction et mise en page du manuscrit	41
4	Résultats	42
4.1	Le bourgeon de rosier : un organe puits	42
4.1.1	Besoin en sucre des bourgeons pour débourrer	42
4.1.1.1	A la lumière	42
4.1.1.2	A l'obscurité	44
4.1.2	Teneur en sucres dans les bourgeons cultivés <i>in vitro</i> en absence ou présence de sucres exogènes	44
4.1.2.1	Teneur en sucres des bourgeons cultivés à la lumière	44
4.1.2.2	Teneur en sucres des bourgeons cultivés à l'obscurité	45
4.1.3	Accumulation de sucres par les bourgeons exposés à la lumière ou à l'obscurité après la décapitation	45
4.1.4	État des connexions symplasmiques entre la tige et le bourgeon	46
4.1.5	Conclusions	46
4.2	Implication des transporteurs de saccharose (SUC) dans le photocontrôle du débourrement	48
4.2.1	Clonage des séquences et analyses phylogénétiques	48
4.2.2	Niveaux d'ARNm des SUC dans les différents organes	50
4.2.3	Niveaux d'ARNm des SUC dans les bourgeons en relation avec le photocontrôle du débourrement	50
4.2.4	Régulation du niveau d'ARNm de <i>RhSUC2</i> , <i>RhSUC3</i> et <i>RhSUC4</i> par l'auxine dans le bourgeon	51
4.2.5	Caractérisation fonctionnelle de RhSUC2 en système hétérologue de levure	51
4.2.6	Conclusions	53
4.3	Implication des transporteurs de monosaccharides (MST) dans le photocontrôle du débourrement	54
4.3.1	Isolement des séquences et analyses phylogénétiques	54
4.3.2	Niveau d'ARNm des MST dans les différents organes	57

4.3.3	Niveaux d'ARNm des MST dans les bourgeons en relation avec le photocontrôle du débourrement	57
4.3.4	Conclusions	58
5	Discussion	59
5.1	La lumière, nécessaire au débourrement, régule l'activité puits du bourgeon . . .	60
5.2	Rôle des transporteurs de saccharose dans le photocontrôle du débourrement . . .	61
5.2.1	Transporteurs de saccharose exprimés dans le bourgeon végétatif de rosier	62
5.2.2	Rôle de <i>RhSUC2</i> dans le photocontrôle du débournement	63
5.2.3	Régulation de l'expression de <i>RhSUC2</i> par les hormones et la lumière . . .	64
5.3	Rôle des transporteurs de monosaccharides dans le photocontrôle du débournement	65
5.3.1	Transporteurs d'hexoses exprimés dans le bourgeon axillaire de rosier . . .	66
5.3.2	Rôle potentiel de <i>RhSTP1</i> dans le photocontrôle du débournement	67
5.3.3	Rôle potentiel de <i>RhTMT2</i> dans le photocontrôle du débournement	69
5.4	Rôle potentiel des sucres dans le bourgeon	69
6	Conclusions et Perspectives	73
	Annexes	96
A	Composition du milieu de Murashige & Skoog modifié	97
B	Tampon d'extraction des sucres	99
C	Transcription inverse	101
D	Conditions d'amplification pour les PCR semi-quantitatives	103
E	Amorces de PCR semi-quantitative et quantitative	105
F	Amorces dégénérées pour le clonage des transporteurs de sucre	107
G	Conditions d'amplification pour les PCR sur PCR	110
H	Transformation bactérienne	112
I	Conditions d'amplification pour les PCR sur bactéries	114
J	Conditions d'amplification pour les RACE	116
K	Conditions d'amplification pour la PCR quantitative en temps réel	118
L	Le vecteur d'expression en levure pDR296	120
M	Transformation de levures	122
N	Caractérisation fonctionnelle de <i>RhSUC2</i>	124
O	Noms et numéros d'accésion des séquences protéiques de transporteurs utilisées pour réaliser les arbres phylogénétiques	128
P	Alignement des séquences nucléiques des transporteurs de rosier à celles de leurs homologues chez l'arabette	131

Chapitre 1

Introduction

L'architecture d'une plante est définie par le nombre d'axes (ou tiges) feuillés, leur longueur et leur agencement dans l'espace. Elle dépend fortement de la capacité de ces derniers à croître et se ramifier. Les ramifications d'un axe feuillé proviennent toutes du développement d'un bourgeon végétatif caulinaire, généralement soumis à des phénomènes de dormance. Le débourrement correspond à la reprise de croissance du bourgeon après la levée de dormance. Cette étape fait intervenir des processus d'allongement et d'organogénèse (Champagnat et al., 1986) et elle est finement régulée par des facteurs endogènes et exogènes.

Parmi les facteurs endogènes, les hormones (auxine, strigolactones et cytokinines) participent à la régulation du débourrement, notamment dans le cas de paradormance telles que la dominance apicale (voir Ferguson et Beveridge (2009) pour modèle récent). La disponibilité en sucres du bourgeon joue également un rôle important dans le débourrement. Des travaux réalisés chez diverses espèces montrent que ce dernier s'accompagne de modifications des teneurs en sucres (Rinne et al., 1994b; Pezet-si Mohamed, 1987; Marquat et al., 1999; Decourteix et al., 2008), de l'activité du métabolisme glucidique (Maurel et al., 2004; Girault et al., 2010) et de la capacité d'importation des sucres (Maurel et al., 2004; Decourteix et al., 2008) dans le bourgeon et/ou de la portion de tige adjacente. La provenance des sucres utilisés pour le débourrement et la manière dont ceux-ci peuvent être transportés vers ou au sein du bourgeon ont cependant peu été étudiées.

Parmi les facteurs exogènes agissant sur le débourrement, la lumière joue un rôle primordial. En effet, chez diverses espèces végétales elle peut agir sur ce processus de par sa quantité (Bartlett et Remphrey, 1998; Marks et Simpson, 1999; Girault et al., 2008), sa qualité (Marks et Simpson, 1999; Muleo et al., 2001; Muleo et Morini, 2006; Finlayson et al., 2010; Kebrom et al., 2006) et sa périodicité (Nienstaedt, 1966; Heide, 1993a; Fustec et Beaujard, 2000). Chez certaines plantes comme le rosier, l'absence de lumière inhibe totalement le débourrement et ce même en l'absence d'inhibitions corrélatives (Khayat et Zieslin, 1982; Girault et al., 2008). Ce n'est cependant pas le cas chez d'autres plantes modèles comme l'arabette, la tomate et le peuplier (Girault et al., 2008). Le besoin absolu de lumière pour assurer le débourrement du bourgeon n'est donc pas un caractère générique. Par conséquent, le rosier est un bon modèle pour étudier l'effet de la lumière sur le débourrement.

Le rosier buisson est une plante ornementale de fort intérêt économique. En effet, le commerce des rosiers d'ornement représente 92,1 millions d'Euros, soit 9,6 % des ventes françaises de végétaux d'extérieur en 2009. De plus, il est en constante progression, il a notamment subi une hausse de 8 % entre 2007 et 2009 (Viniflor, 2010). La qualité visuelle d'une plante d'ornement est un critère de choix important pour les consommateurs. Elle dépend de nombreux

critères comme les fleurs (nombre, couleur, taille, densité des pétales...), le feuillage (densité, couleur et taille des feuilles), les tiges (nombre, vigueur et degré de ramification) ainsi que la forme de la plante (forme globale et symétrie) (Boumaza et al., 2009). La forme globale d'une plante est déterminée par son architecture (Oldeman, 1974). Les horticulteurs utilisent couramment la taille manuelle ou des traitements chimiques à base de molécules nanifiantes (ex : Bonzi) pour modifier l'architecture de la plante. Cependant, ces techniques sont fastidieuses ou nocives pour l'Homme et l'environnement. Il est donc nécessaire d'investir dans la recherche de méthodes alternatives permettant d'obtenir des plantes de forme souhaitée.

Les conditions environnementales telles que l'éclairage, la température et le taux d'humidité atmosphérique, ainsi que la disponibilité en azote dans le milieu jouent un rôle primordial dans le développement de la plante et la mise en place de son architecture (Fustec et Beaujard, 2000; Mortensen, 2000; Patel et Franklin, 2009). Il est donc possible de modifier l'architecture d'une plante en modulant les apports nutritifs et les conditions environnementales utilisés pour sa culture. La compréhension de l'effet des divers facteurs de l'environnement est donc de toute première importance dans la perspective de pouvoir contrôler l'architecture de la plante par le biais d'itinéraires techniques adaptés.

C'est dans ce contexte scientifique que s'insèrent les travaux de l'UMR SAGAH (Unité Mixte de Recherche des Sciences Agronomiques Appliquées à l'Horticulture) A462 (INRA / Agrocampus-Ouest-Centre Angers / Université d'Angers), au sein duquel ce travail de thèse a été réalisé. Les travaux de l'UMR s'organisent autour de trois axes de recherche :

1. La caractérisation de la qualité esthétique du rosier.
2. La caractérisation de l'architecture du rosier buisson.
3. Le déterminisme physiologique et moléculaire de la mise en place de l'architecture en réponse aux facteurs environnementaux.

Ils sont basés sur une approche de biologie intégrative (allant de l'échelle de la plante entière à celle du gène), dans le but de comprendre l'impact des facteurs environnementaux sur l'architecture et dans la perspective d'élaborer un modèle dynamique structure-fonction décrivant la mise en place de l'architecture du rosier en fonction de l'environnement.

Mes travaux de thèse s'insèrent dans le cadre du troisième axe de recherche de l'UMR et visent à comprendre une part les mécanismes physiologiques et moléculaires sous-jacents au contrôle du débourrement du bourgeon par l'environnement. Les données générées pourront entre autre servir de base pour construire le modèle structure-fonction souhaité. Etant donné que la lumière est nécessaire au débourrement, l'équipe a dans un premier temps choisi de concentrer ses efforts sur l'étude de ce facteur. De récents travaux de l'équipe ont notamment permis de montrer que la régulation du débourrement par la lumière s'accompagne d'une mobilisation des réserves glucidiques (modification des teneurs en sucres et de l'activité métabolique) du bourgeon et de la portion de tige adjacente (Girault et al., 2010). L'objectif principal de mon travail a donc été d'élucider le rôle des flux de sucres vers le bourgeon dans le photocontrôle du débourrement. Après avoir présenté les données bibliographiques qui ont orienté nos travaux de recherche et défini les questions posées, nous présenterons les résultats obtenus sous forme de trois chapitres.

Le premier vise à décrire l'activité puits du bourgeon de rosier lors du débourrement régulé par la lumière. Les besoins en sucre des bourgeons ainsi que leur capacité à les importer sous influence de la lumière ont été déterminés à l'aide d'approches morphologiques, biochimiques et histologiques.

Les second et troisième chapitres détaillent respectivement le rôle des transporteurs de saccharose et de monosaccharides dans la régulation du débourrement par la lumière. L'identification et la caractérisation du rôle de ces différents transporteurs ont été réalisées à l'aide d'approches moléculaires et biochimiques.

Les résultats présentés font alors l'objet d'une discussion générale dans laquelle est proposée un modèle du photocontrôle du débourrement des bourgeons de rosier.

Chapitre 2

Données Bibliographiques

2.1 Le rosier

2.1.1 Historique et classification

Le rosier est une plante pérenne et ligneuse de petite taille. Les rosiers appartiennent tous au genre *Rosa* qui regroupe plus de 150 espèces (Matsumoto et al., 1998). Le genre *Rosa* est sous-divisé en 4 grands sous-genres : *Eurosa*, *Hesperhodos*, *Hulthemia* et *Platyrhodon*. Le sous-genre *Eurosa* est celui qui regroupe le plus grand nombre d'espèces (Matsumoto et al., 1998). Sa domestication pour une utilisation à des fins ornementales remonte à l'antiquité (Meynet, 2001). Parmi le grand nombre d'espèces de rosier existantes, seul 7 à 10 d'entre elles auraient participé à la création des plus de 20000 cultivars de rosiers commercialisés à l'heure actuelle (Matsumoto et al., 1998; Rajapakse et al., 2001; Martin et al., 2001). Les 7 espèces suivantes auraient notamment contribué à la création des rosiers modernes commercialisés : *Rosa foetida*, *R. gallica*, *R. moschata*, *R. multiflora*, *R. wichuraiana*, *R. chinensis* et *R. gigantea* (Matsumoto et al., 1998). Un croisement entre les espèces *R. rugosa* et *R. wichuraiana* aurait permis d'obtenir un hybride : *R. hordesii* remontant et très résistant au froid, très utilisé pour l'obtention de rosiers de jardin (Meynet, 2001).

2.1.2 Enjeux économiques de la culture du rosier et attentes des producteurs

Le rosier est la plante ornementale la plus importante sur le plan économique à travers le monde (Rajapakse et al., 2001; Gudin, 2000). Il est notamment cultivé pour la production de fleurs coupées, de plants d'extérieur (jardin et aménagement d'espaces verts) et d'intérieur (en pot) ainsi que pour extraire des huiles essentielles utilisées dans l'industrie du parfum (Gudin, 2000).

La rose est la fleur coupée dont la culture se développe le plus sur le plan mondial. Pendant longtemps sa culture s'est limitée aux producteurs du Nord, compte tenu du niveau élevé d'investissements requis et des difficultés rencontrées (maîtrise des techniques culturales, difficultés de manutention, problèmes de transport...). L'amélioration des techniques de manutention et l'apparition de variétés adaptées ont permis le développement de cette culture dans un espace géographique plus étendu. La production se développe notamment en Israël, dans certains pays africains et en Amérique latine. En France, la rose est la fleur coupée la plus vendue. En 2008, elle représentait respectivement 69 % et 48 % des sommes dépensées par les français pour l'achat des fleurs coupées à la pièce ou en bottes.

La seconde grande source de production de rosiers est destinée à l'ornement. En 2009, la vente française des végétaux d'ornement a rapporté 3,24 milliards d'euros, dont 956 millions ont été consacrés à l'achat de végétaux d'extérieur. Les rosiers d'ornement représentaient alors 9,6 % des dépenses pour l'achat de végétaux d'extérieur, soit 92,1 millions d'euros. La vente des rosiers d'ornements est en constante progression depuis 2006 (71 % d'augmentation entre 2006 et 2009) (Viniflor, 2010). Le rosier d'ornement représente donc un intérêt économique majeur à l'échelle nationale.

Depuis leur domestication par l'Homme, les rosiers ont été sélectionnés pour divers critères (Meynet, 2001). D'une manière générale, la domestication des rosiers s'est quasiment toujours traduite par un phénomène de duplication résultant de la transformation d'étamines en pétales. Au début du XIX^{ème} siècle, l'essor des échanges commerciaux entre l'Angleterre et l'Orient, la naissance de la botanique moderne (à la suite des travaux de Buffon et de Linné) et l'engouement de la société pour la nature, les jardins et tout particulièrement les roses se traduit par l'apparition de nombreux "hybrideurs" de rosier et la création de la Société Nationale d'Horticulture de France (1827). A cette époque, les rosiers de Chine, introduits en Europe depuis la fin du XVIII^{ème}, sont utilisés pour associer leur floraison remontante aux qualités déjà exploitées des anciens rosiers européens. Ces croisements ont donné naissance à 2 grands types d'hybrides : les "rosiers Thé" et les "hybrides remontants". Les "rosiers Thé" sont diploïdes et remontants mais sensibles au froid. Les hybrides remontants sont tétraploïdes, rustiques mais sont peu remontants, contrairement à ce que laisse supposer leur dénomination.

A la fin du XIX^{ème}, des croisements réalisés entre les rosiers Thé et les hybrides remontants par Guillot afin d'obtenir des rosiers rustiques remontants permettent l'obtention d'un rosier triploïde : "La France". Ce rosier est considéré comme le prototype des hybrides de Thé qui en dériveront et donc des rosiers modernes. A la même époque, Pernet-Ducher réussit à introduire la couleur jaune dans les hybrides de Thé par croisement avec *R. foetida*. Ce croisement donna naissance à un hybride tétraploïde : "Soleil d'or", à l'origine de l'introduction des caroténoïdes dans la palette de couleur des rosiers modernes.

Au début du XX^{ème}, un second pigment (la pélagonidine, anthocyané orange) est apparu spontanément dans les hybrides de polyantha. Ce pigment fut ensuite introduit dans les hybrides de Thé par Kordes. A la même période, le déplacement des cultures de rosiers vers le Nord de l'Europe et l'Amérique a poussé les hybrideurs à introduire des caractères de résistance à de nouvelles contraintes, notamment le froid. C'est alors que fut créé l'hybride *R. hordesii*, utilisé pour la production de nombreux rosiers de jardins. Après 1945, les ressources génétiques des espèces botaniques sont introduites dans les hybrides de Thé par les sélectionneurs français (Meilland, Delbard...) afin de créer de nouveaux types de rosiers adaptés à de nombreux usages. C'est alors que sont apparus les rosiers pour la production de fleur coupées, les rosiers miniatures, les rosiers utilisés pour orner les espaces urbains. Parallèlement les sélectionneurs ont élargi la gamme des rosiers de jardin en y introduisant de nouveaux caractères tels que la duplication et le parfum.

Actuellement les recherches des sélectionneurs se concentrent sur l'introduction de caractères de résistance aux maladies ainsi que sur le développement de la transgénèse du rosier, outil précieux pour la manipulation génétique de ce dernier (Meynet, 2001). Le port des rosiers est un critère important de sélection car il détermine leur utilisation en tant que plante ornementale. Jusqu'à présent, les sélectionneurs ont essentiellement cherché à produire des rosiers buissons, couvre-sol, grimpants, lianes, tiges et pleureurs pour l'ornement des jardins (Delbard, 2010). Les méthodes couramment utilisées pour modifier le port des rosiers sont la taille (ma-

nuelle ou mécanique) et l'application de nanifiants (molécules de synthèse qui freinent ou suppriment l'élongation des tiges) telles que le Bonzi (paclobutrazol) (<http://e-phy.agriculture.gouv.fr/>). Ces méthodes sont cependant fastidieuses et/ou nocives pour l'Homme et l'environnement. L'utilisation des molécules nanifiantes est de plus en plus prohibée pour cette raison. Il devient donc impératif de trouver des méthodes alternatives permettant d'obtenir des rosiers de port souhaité.

Les critères de sélection dont le déterminisme génétique a été étudié chez le rosier concernent : la remontée de floraison, le nombre de pétales, la couleur de la fleur, le parfum, la stérilité mâle, la présence d'épines, la résistance aux maladies (tache noire et oïdium) et au froid, la vigueur et le nanisme (Rajapakse et al., 2001; Martin et al., 2001; Crespel et al., 2002; Wu et al., 2004; Yan et al., 2005). Peu de données sont donc disponibles sur les caractères qui contrôlent le port de la plante.

2.2 La qualité visuelle et l'architecture

2.2.1 La qualité visuelle et les préférences des consommateurs

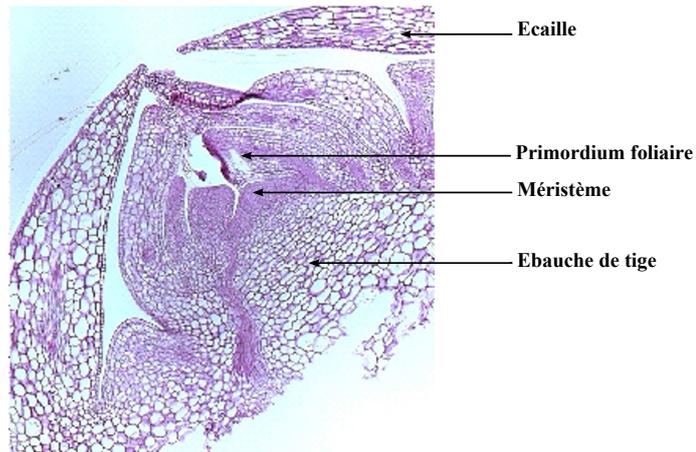
La qualité visuelle (ou qualité esthétique) est un critère commercial majeur pour les plantes d'ornement comme le rosier. La qualité visuelle d'une plante ornementale dépend d'attributs visuels très pertinents tels que la largeur, la forme et la densité du buisson (Boumaza et al., 2009). Boumaza et al. (2009) ont défini 18 attributs visuels permettant de décrire la qualité visuelle d'un rosier de façon objective. Ces attributs portent notamment sur les fleurs (quantité, taille, couleur, position, stade de développement, densité + forme des pétales), les bourgeons (quantité et forme), les feuilles (taille, couleur et qualité sanitaire), la vigueur des tiges et la forme générale de la plante (forme et densité du feuillage). Une étude récente portant sur le rosier de jardin a permis d'associer les préférences des consommateurs à des profils sensoriels (Boumaza et al., 2010). Les profils sensoriels de 10 rosiers ont été définis par un jury d'experts à l'aide de 16 attributs visuels. Une étude de préférence a été réalisée sur ces mêmes rosiers par 253 consommateurs. D'une manière générale, les consommateurs préfèrent les rosiers larges et denses avec beaucoup de branches fines arborant un grand nombre de fleurs et de petites feuilles. A contrario, les rosiers peu ramifiés à la base, avec seulement quelques tiges très vigoureuses arborant peu de fleurs sont dépréciés (Boumaza et al., 2010). Les préférences des consommateurs sont donc fortement dépendantes des profils de ramification, de la vigueur des axes et de l'architecture globale du rosier.

2.2.2 L'architecture

L'architecture d'une plante représente l'ensemble des formes structurales que l'on peut observer à un moment donné (Oldeman, 1974). C'est donc l'architecture qui définit la forme globale d'une plante. L'élément de base sur lequel repose l'architecture végétale est l'axe feuillé ou tige feuillée. L'axe feuillé est élaboré par un méristème apical caulinaire et composé d'une série de métamères (Barthélémy et al., 1995).

Un métamère correspond à l'ensemble formé d'un entre-noeud, d'un noeud et d'un bourgeon axillé par une feuille (White, 1979). Chaque bourgeon axillaire peut éventuellement se développer pour former un nouvel axe feuillé appelé ramification. L'architecture d'une plante dépend de la nature (florifère = défini ou végétatif = indéfini), du nombre, de la position et de

a



b

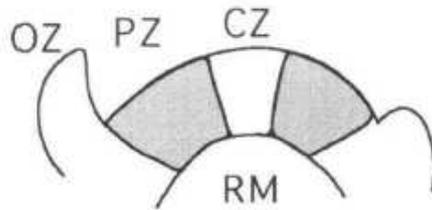


FIGURE 1 – Structure d’un bourgeon végétatif. a. Coupe longitudinale d’un bourgeon axillaire de *Rosa hybrida* cv ‘Radrazz’ (Girault, 2009). Le méristème est recouvert par des primordia foliaires et des écailles (ou cataphylles). L’ensemble des ces pièces sont rattachées à l’ébauche de tige aux entre-nœuds réduits. **b. Représentation schématique d’un méristème caulinaire et des zones qui le composent en vue longitudinale d’après Clark (1997).** Le méristème peut être divisé en 4 zones : la zone centrale (CZ), la zone périphérique (PZ) ou anneau initial, la zone d’organe (OZ) correspondant à un primordium en cours de formation et la zone médullaire (RM).

la longueur de ses axes. Les modes de croissance et de ramification, la position de la floraison, la croissance orthotrope ou plagiotrope font partie des critères permettant de classer les arbres dans des modèles architecturaux donnés (Barthélémy et al., 1995). Le rosier buisson est une plante pérenne et ligneuse. Il présente de nombreuses ramifications basales et des axes à croissance définie, résultant d'une floraison terminale (Marcelis-van Acker, 1994). Son architecture peut être décomposée en un ensemble d'unités architecturales (Morel et al., 2009). Chez les arbres, l'unité architecturale caractérise l'architecture élémentaire au sein d'une même espèce (Barthélémy et al., 1995). Chez les rosiers hybrides de Thé (*Rosa hybrida* cv "Radrazz" et "Meiratcan"), chaque unité architecturale est composée d'axes longs et courts. Les proportions de ces derniers varient progressivement selon l'ordre de ramification. Au premier ordre de ramification 100 % des axes sont longs alors qu'au dernier ordre de ramification 100 % des axes sont courts (Morel et al., 2009). L'architecture du rosier dépend donc fortement de la capacité des différents bourgeons axillaires à se développer pour donner de nouveaux axes.

2.3 Le bourgeon et son fonctionnement

2.3.1 Le bourgeon

Le bourgeon végétatif est une structure complexe (Figure 1 a). Il est défini comme une pousse non déployée et partiellement développée, possédant à son sommet le méristème qui l'a produite. Ce dernier est habituellement protégé et recouvert par des primordia de feuilles et par les cataphylles (écailles) (Barthélémy et al., 2000). Sur un axe on distingue le bourgeon terminal ou apical (situé à son extrémité) des bourgeons axillaires (disposés à l'aisselle des feuilles). Chez le rosier buisson, plante à floraison terminale, l'apex assure la formation d'organe(s) reproducteur(s) (fleur ou inflorescence suivant l'espèce considérée) alors que les bourgeons axillaires assurent généralement la formation de ramifications (tiges feuillées à floraison terminale).

Dans un bourgeon, la formation de nouveaux organes est assurée par l'activité du méristème caulinaire. Chez les Angiospermes, le méristème caulinaire peut être divisé en 4 régions fonctionnelles (Figure 1 b) (Clark, 1997) :

- **La zone centrale (CZ)** : localisée au centre du méristème et composée de cellules indifférenciées présentant une faible activité mitotique. Cette zone permet le maintien de l'activité du méristème.
- **La zone périphérique (PZ) ou anneau initial** : forme un anneau autour de la CZ. Il est composé de cellules en cours de différenciation présentant une forte activité mitotique. C'est la zone où se forment les nouveaux organes.
- **La zone d'organes (OZ) ou primordium foliaire** : en périphérie du méristème. C'est la zone où les organes nouvellement formés sont en cours de développement. Ils sont alors morphologiquement distincts.
- **La zone médullaire (RM)** : sous-jacente aux trois zones décrites précédemment. Elle est composée de cellules présentant une forte activité mitotique et donnant naissance à la vascularisation et aux structures internes de la tige.

2.3.2 Le fonctionnement du bourgeon

Dans une plante, les nouveaux axes formés proviennent tous du développement d'un bourgeon végétatif. La croissance primaire d'un axe comprend deux processus complémentaires : l'organogénèse et l'allongement (Champagnat et al., 1986). Ces deux processus peuvent avoir lieu simultanément ou être décalés dans le temps. La portion de tige présente à l'état d'ébauche avant le débourrement des bourgeons est qualifiée de partie préformée, alors que celle formée suite au débourrement est qualifiée de néoformée (Caraglio et Barthélémy, 1997; Barthélémy et al., 2000). En fonction de l'espèce considérée et de la position des bourgeons dont ils sont issus, les axes peuvent être entièrement préformés (Sabatier et Barthélémy, 2001; Puntieri et al., 2002; Sabatier et al., 2003), entièrement néoformés (Borchert, 1969) ou constituées d'une partie préformée et d'une autre néoformée (Puntieri et al., 2002; Gordon et al., 2006; Guédon et al., 2006). Les bourgeons axillaires de rosier (*Rosa hybrida* cv 'Radrazz' et 'Meiprille' et *Rosa wichuraiana* cv 'Basye's thornless') situés dans la zone basale de l'axe primaire sont constitués à la fois de primordia foliaires préformés et néoformés (Girault et al., 2008).

Une fois formé, le bourgeon peut immédiatement croître ou entrer en phase de latence, on peut respectivement qualifier ces bourgeons de sylleptique et proleptique (Barthélémy et al., 2000). Chez les bourgeons proleptiques, la période de latence durant laquelle leur développement est temporairement suspendu peut également être qualifiée de période de dormance. La dormance correspond à une suspension temporaire de la croissance visible de toute structure végétale contenant un méristème (Lang et al., 1987). Trois types de dormances sont distingués en fonction des causes de l'arrêt de croissance et des besoins spécifiques pour le rompre (Lang et al., 1987; Horvath et al., 2003) :

- **L'écodormance** : inclue tous les cas de dormance dus à un ou plusieurs facteurs environnementaux défavorables, qui sont généralement non spécifiques dans leur effet sur le métabolisme global de la plante. Le froid et le stress hydrique sont des facteurs qui induisent l'écodormance (Horvath et al., 2003).
- **La paradormance** : est initiée par un signal biochimique spécifique originaire d'une structure autre que la structure affectée. Le phénomène de dominance apicale, où les bourgeons inhibent le développement de leurs voisins sous-jacents via des signaux hormonaux, est un exemple de paradormance (Horvath et al., 2003).
- **L'endodormance** : lorsque la réaction initiale à l'origine de l'arrêt de croissance correspond à la perception spécifique d'un signal environnemental ou endogène au sein de la structure affectée. La lumière et la température sont des facteurs qui ont un rôle important dans l'induction et la levée de l'endodormance des bourgeons (Horvath et al., 2003; Arora et al., 2003).

Ces différents types de dormance peuvent affecter les bourgeons de façon indépendante ou simultanée (Horvath et al., 2003).

Les facteurs responsables de l'entrée en dormance des bourgeons sont externes à la plante et/ou propres à la plante. La succession des différents types de dormances typiquement rencontrée chez les bourgeons des plantes pérennes et/ou des tubercules, ainsi que les facteurs qui les induisent sont représentés en Figure 2. Chez les arbres des zones tempérées, la dormance des bourgeons pendant la période estivale est principalement due à des phénomènes de paradormance (anciennement appelés inhibitions corrélatives) (Champagnat, 1989; Arora et al., 2003). L'exemple le plus étudié de paradormance est la dominance apicale. Lorsque la période hivern-

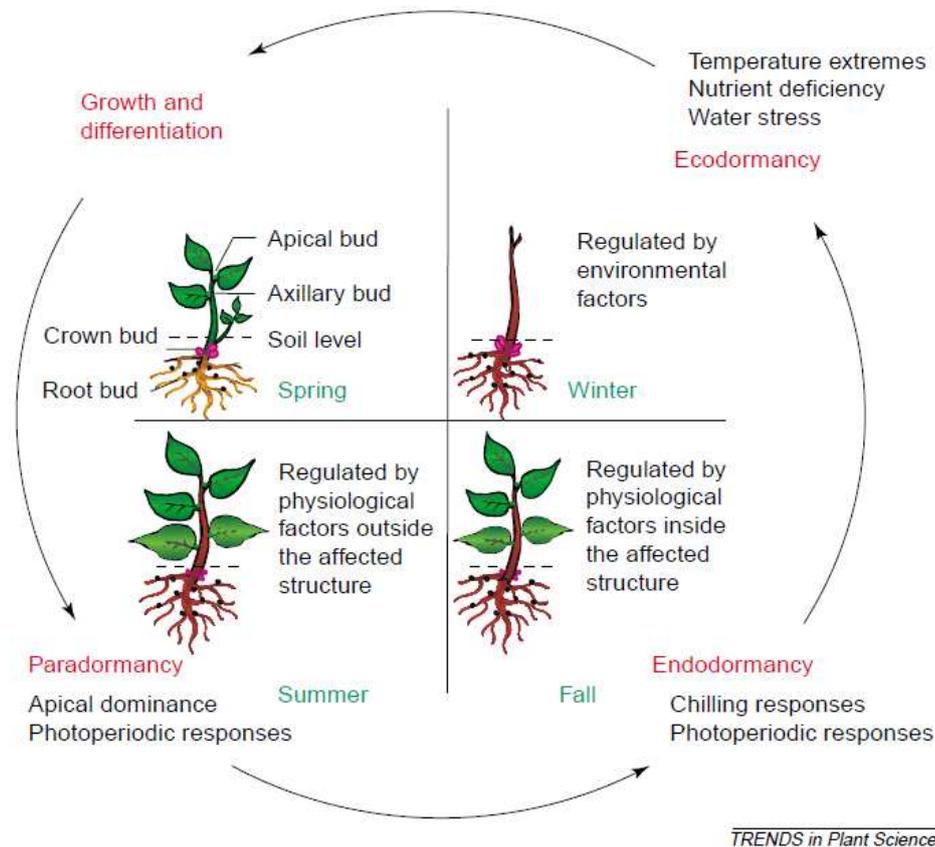


FIGURE 2 – Représentation schématique des signaux et des saisons typiques des différents types de dormance d’après Horvath et al. (2003). La succession des différents types de dormances définis par Lang et al. (1987) et des signaux et saisons qui sont généralement associés à la dormance des plantes pérennes (herbacées et ligneuses) et des bourgeons caulinaires de tubercules.

ale survient, les conditions environnementales sont défavorables au développement des bourgeons qui entrent alors progressivement en endodormance puis en écodormance. Chez les plantes pérennes et ligneuses, le passage de la paradormance à l'endo- et l'écodormance des bourgeons est dû à la réduction de la photopériode et la baisse des températures. Au printemps, le retour à des températures plus chaudes engendre une levée de dormance (Arora et al., 2003).

Une fois les différents types de dormance levés, les bourgeons reprennent leur développement et donnent naissance à un nouvel axe. L'étape consistant à la reprise de croissance du bourgeon écailleux à la suite de la levée de dormance et aboutissant au dégagement des pièces foliaires ou florales hors des écailles qui les contiennent peut être définie comme le débourrement (Barthélémy et al., 2000). Ce dernier fait généralement intervenir des processus d'organogénèse et d'allongement (Champagnat et al., 1986).

Chez le rosier, lorsque les conditions environnementales sont favorables, le débourrement des bourgeons axillaires est principalement inhibé par des phénomènes de paradormances (ou inhibitions corrélatives). La dominance apicale, la portion de tige au dessus du bourgeon, ainsi que la feuille qui axille ce dernier ont un effet inhibiteur sur son débourrement (Zieslin et Halevy, 1976a). Dans le dernier cas, le débourrement serait inhibé alors que la croissance de la tige feuillée qui s'ensuit serait stimulée par la présence de la feuille axillante. La position du bourgeon sur la tige influe également sur la capacité de ce dernier à débourrer, les bourgeons apicaux débourrant plus rapidement que les basaux (Zieslin et Halevy, 1976b). Divers facteurs environnementaux tels que la lumière, la température et la nutrition azotée ont un effet sur le débourrement des bourgeons axillaires de rosier.

2.4 Les facteurs agissant sur le débourrement

2.4.1 Les facteurs environnementaux

2.4.1.1 La lumière

Le débourrement dépend fortement des conditions environnementales dans lesquelles se trouve le bourgeon. Chez certaines espèces comme le prunier (Muleo et al., 2001) et le rosier (Khayat et Zieslin, 1982; Girault et al., 2008) l'absence de lumière inhibe le débourrement, alors que ce n'est pas le cas chez le pommier (Muleo et Morini, 2006). D'après Khayat et Zieslin (1982); Girault et al. (2008), le bourgeon de rosier a un besoin absolu de lumière pour débourrer, et ce même en l'absence d'inhibition corrélative. Ce qui n'est pas le cas de certaines espèces modèles telles que l'arabette, la tomate et le peuplier (Girault et al., 2008).

L'intensité lumineuse peut affecter le débourrement des bourgeons. Chez le frêne rouge, le nombre de bourgeons axillaires débourrants est proportionnel à l'intensité lumineuse (entre 4 % et 40 % d'éclairement par la lumière naturelle) et arrive à son maximum lorsque celle-ci atteint 40 % d'éclairement (Bartlett et Remphrey, 1998). En conditions *in vitro*, les sections de tiges de rhododendron exposées à des intensités lumineuses croissantes (comprises entre 10 et 110 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) présentent une augmentation du nombre de débourrement (avec un maximum observé à 55 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) (Marks et Simpson, 1999). Chez divers cultivars de rosier, après la levée de la dominance apicale, le pourcentage de débourrement des bourgeons distaux est généralement stimulé lorsque l'intensité lumineuse augmente (Girault et al., 2008).

La qualité de la lumière apportée au bourgeon influe également sur le débourrement. En système de culture *in vitro*, la lumière rouge clair stimule le débourrement chez le *Disanthus* (Marks et Simpson, 1999) et l'inhibe chez le prunier, de même que la lumière rouge sombre (Muleo et al., 2001). La lumière bleue inhibe le débourrement du rhododendron, alors qu'elle stimule celui de l'aubépine au même titre que la lumière verte (Marks et Simpson, 1999). *In planta*, la lumière bleue stimule la différenciation de bourgeons axillaires à partir du méristème apical sans affecter la dominance apicale chez le prunier. A contrario, la lumière rouge clair réduit la formation de bourgeons axillaires et supprime la dominance apicale, stimulant ainsi le débourrement. Le rouge sombre a, quant à lui, tendance à l'inhiber (Muleo et al., 2001). Un phénomène similaire est observé chez des tiges de pommier cultivées *in vitro* (Muleo et Morini, 2006, 2008). Chez les plantes entières d'arabette (Finlayson et al., 2010) et de sorgho (Kebrom et al., 2006), le débourrement des bourgeons est inhibé par un faible ratio rouge clair/rouge sombre (Rc :Rs) et par la mutation du phytochrome B (photorécepteur majeur dans la perception du Rc :Rs). Chez le rosier, après la levée de dominance apicale, les lumières rouge clair et bleue permettent le débourrement des bourgeons (Girault et al., 2008).

Chez certaines espèces, la durée de la photopériode modifie également les profils de débourrement. Chez le rhododendron, les jours courts favorisent la basitonie alors que les jours longs favorisent l'acrotonie (Fustec et Beaujard, 2000). L'exposition des bourgeons à de longues photopériodes permet de compenser l'absence de gel et d'induire le débourrement des bourgeons d'épicéa (Nienstaedt, 1966) et de hêtre (Heide, 1993a). Les photopériodes longues permettent également de réduire le temps thermique (degrès jours > 0 °C) nécessaire au débourrement des bourgeons de bouleau, de merisier, de peuplier, d'aulne et de noisetier (Heide, 1993b).

Nous avons vu que la lumière joue un rôle primordial dans le contrôle du débourrement, notamment chez le rosier où elle est nécessaire à ce processus. Nous avons donc choisi d'axer nos recherches sur l'effet de la lumière sur le débourrement en comparant deux conditions contrastées : présence de lumière (favorable au débourrement) *versus* absence de lumière (limitante au débourrement). Cependant, d'autres facteurs environnementaux ont une influence sur le débourrement et pourraient également agir sur la mobilisation des réserves par le bourgeon.

2.4.1.2 La température

La température a une influence importante sur le débourrement. Chez les plantes pérennes et ligneuses, un traitement des bourgeons par des températures gelives est souvent nécessaire à la levée de dormance. C'est notamment le cas chez l'épicéa (Nienstaedt, 1966), le hêtre (Heide, 1993a), le bouleau, le saule (Pop et al., 2000), le pommier et le poirier (Heide et Prestrud, 2005). Chez certaines espèces, le temps thermique nécessaire au débourrement des bourgeons diminue de manière non linéaire avec l'augmentation de la durée d'exposition des plantes à des températures gelantes (Heide, 1993b). La température printanière a également une influence sur le débourrement, qui a lieu plus rapidement lorsque cette dernière est plus élevée, comme l'indiquent des travaux réalisés sur des bourgeons de saule et de bouleau préalablement traités par le gel (Pop et al., 2000). Chez le saule polaire, la température optimale pour le débourrement des bourgeons préalablement traités par des températures gelantes est de 15 °C, à des températures inférieures ce processus est ralenti (Paus et al., 1986). Chez le rosier, l'exposition à des températures froides (4 °C) pendant une semaine stimule le débourrement des bourgeons basaux, normalement inhibé par la dominance apicale (Khayat et Zieslin, 1982).

2.4.1.3 La disponibilité en azote et en eau dans le milieu

Chez le rhododendron, une privation d'azote pendant 6 semaines favorise le débourrement des bourgeons basaux (Fustec et Beaujard, 2000). Ferguson et Beveridge (2009) ont montré chez des pois décapités qu'une carence en azote n'affecte pas directement le débourrement des bourgeons axillaires mais plutôt la croissance des tiges qui en sont issues. Chez le rosier, une carence en azote du stade "bouture" à celui de "couleur pétale visible" (stade où la fleur terminale de l'axe d'ordre I commence à s'épanouir) engendre une diminution du débourrement des bourgeons de la zone apicale et une augmentation de ceux des zones médianes et basales de l'axe (Lydie Huché-Thélier, communication personnelle).

Une restriction hydrique de 7 jours (obtenue après 11 jours de non irrigation), appliquée à des rosiers dont l'axe d'ordre I est au stade "bouton floral visible" (stade après lequel l'effet de la dominance apicale est supprimée), stimule le débourrement des bourgeons axillaires (Lydie Huché-Thélier, communication personnelle).

2.4.2 Les facteurs endogènes à la plante

2.4.2.1 Les sucres

Le débourrement des bourgeons s'accompagne généralement de variations quantitatives et qualitatives des teneurs en sucres dans le bourgeon. Chez le frêne et le bouleau on constate une hydrolyse de l'amidon en période de débourrement (Cottignies, 1985; Rinne et al., 1994a). Chez le chataîgnier et le peuplier on note une augmentation des sucres solubles à la même période (Pezet-si Mohamed, 1987; Bonicel et Vercosa de Médeiros Raposo, 1990).

Les variations de teneurs en sucres dans les bourgeons en cours de débourrement ou dans la portion de tige adjacente s'accompagnent d'une modification de la force puits du bourgeon. Dans une jeune tige feuillée de *Lolium temulentum*, le méristème apical caulinaire reçoit à lui seul 18 à 27 % du CO₂ fraîchement assimilé par cette dernière (Ryle, 1972). Dans les bourgeons de pêcher la teneur en saccharose diminue au profit de celle en stachyose, raffinose et fructose durant la période de débourrement (Marquat et al., 1999). Une étude complémentaire montre que la capacité de débourrement des bourgeons est corrélée à la quantité d'hexoses dans le bourgeon, ainsi qu'à sa capacité à importer le glucose, le saccharose et le sorbitol (Maurel et al., 2004). Parallèlement on observe une augmentation du taux de transcrit (Gévaudant et al., 2001) et de l'activité (Aue et al., 1999) de certaines ATPases dans le bourgeon et les tissus sous-jacents. Ces résultats indiquent qu'une importation active d'hexoses serait nécessaire au débourrement du bourgeon de pêcher. Chez le noyer, l'aptitude des bourgeons à débousser est corrélée à leur capacité à importer du saccharose. Elle est également concomitante à une augmentation de la quantité de saccharose dans la sève xylémienne et à l'induction de l'expression du transporteur de saccharose *JrSUT1* dans les cellules associées aux vaisseaux du xylème de la portion de tige adjacente (Decourteix et al., 2008). Lors du débourrement, la quantité en saccharose et en amidon augmente fortement dans les bourgeons du tubercule de pomme de terre. La mise en place de connexions symplasmiques entre le bourgeon et le tubercule sont par ailleurs nécessaires au débourrement (Viola et al., 2007). Dans ce cas, l'importation des sucres s'effectuerait principalement par diffusion au travers des connexions symplasmiques (plasmodesmes).

Chez certaines espèces le débourrement implique également une modification de l'activité métabolique du bourgeon. L'expression de la saccharose synthase (Susy), une enzyme de dégradation du saccharose en hexoses est stimulée dans les bourgeons de vigne entre 24 et 96 h

après induction chimique du débourrement (Keilin et al., 2007; Halaly et al., 2008). On observe chez le pêcher, juste avant le débourrement, une augmentation de l'activité de l'invertase vacuolaire des tissus méristématiques du bourgeon (Maurel et al., 2004).

Les sucres pourraient notamment agir sur le débourrement de part leur rôle trophique mais également de part leur rôle signal. Chez l'arabette, le saccharose induit l'expression et l'activité kinase des cyclines D2 et D3, responsables du passage des cellules de la phase G1 à S (Riou-Khamlichi et al., 2000). De même, le saccharose et le glucose induisent l'expression de la cycline D (*Nicta*; *CycD3*;4) ainsi que les divisions cellulaires, chez le tabac sauvage ou surexprimant cette même cycline D (Kwon et Wang, 2010). Ces sucres participent donc à la régulation des divisions cellulaires, en agissant sur l'expression des gènes qui contrôlent le cycle cellulaire. Les sucres favorisent également l'expansion cellulaire en tant que solutés (Schmalstig et Cosgrove, 1990). Ils pourraient donc être impliqués dans la régulation de l'activité mitotique du méristème. SnRK1 (SnF1-Related Protein Kinase), une protéine intégratrice de la réponse de la plante à une carence carbonée, participe à la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la maintenance et la différenciation du méristème ainsi que dans la formation des feuilles (Radchuk et al., 2010). De plus, la N-Myristoylation de SnRK1 est indispensable au développement du méristème caulinaire (Pierre et al., 2007).

Chez le rosier, le débourrement des bourgeons à la lumière s'accompagne principalement d'une mobilisation du saccharose du bourgeon et de la portion de tige adjacente (Girault et al., 2010). La décapitation et l'exposition des plantes à la lumière provoque une diminution des teneurs en saccharose et amidon dans le bourgeon axillaire le plus apical après 24 h, alors que la quantité en hexoses reste stable. Entre 24 et 48 h, les teneurs en saccharose et glucose augmentent, alors que celle en amidon continue de baisser. Ensuite, les teneurs de ces différents sucres augmentent dans le bourgeon et ce jusqu'à 96 h. Parallèlement à l'augmentation de glucose observée après 24 h, on note une induction de l'activité de l'invertase vacuolaire (enzyme de dégradation du saccharose en hexoses). Dans la portion de tige adjacente au bourgeon, on observe une baisse des teneurs en sucre (saccharose, glucose et amidon) durant les 48 h qui suivent la décapitation. Ensuite, les teneurs en saccharose et glucose augmentent alors que celle en amidon continue de diminuer (Girault et al., 2010). Ces résultats indiquent que le bourgeon de rosier utilise des sucres endogènes, ou plus certainement ceux en provenance de la tige pour débourrer à la lumière.

En revanche, chez les rosiers exposés à l'obscurité (condition inhibitrice du débourrement) on observe pas d'accumulation de saccharose, d'hexoses et d'amidon dans le bourgeon à partir de 48 h, ni d'induction de l'activité de l'invertase vacuolaire dans le bourgeon. De même, aucune accumulation de saccharose ou d'hexose n'a lieu dans la portion de tige adjacente.

Les résultats obtenus indiquent qu'une mobilisation des sucres (saccharose et hexoses) en provenance de la tige serait nécessaire au débourrement et participerait à son photocontrôle. Il nous est donc apparu intéressant de déterminer la manière dont ces sucres (saccharose et hexoses) sont importés dans le bourgeon, ainsi que la régulation de cette importation par la lumière. Les données bibliographiques indiquent que l'importation des sucres par les bourgeons pourrait notamment faire intervenir une part active de transport, nous avons donc cherché à identifier des transporteurs de sucres (saccharose et hexoses) impliqués dans ce processus.

Nous avons vu que les sucres sont des acteurs clés du débourrement, cependant d'autres facteurs endogènes agissent sur ce dernier et pourraient entre autre participer à la modulation de la force puits du bourgeon en réponse à la lumière.

2.4.2.2 Les hormones

Les hormones jouent un rôle primordial dans le débourrement, surtout dans le cas des paradormances telles que la dominance apicale. L'auxine et les strigolactones inhibent le débourrement alors que les cytokinines le stimulent (Ferguson et Beveridge, 2009).

L'auxine est notamment synthétisée par les bourgeons caulinaires (méristème et jeunes primordia) et transportée de façon basipète dans la tige (Bohn-Courseau, 2010). Chez de nombreuses espèces, les bourgeons axillaires sont soumis au phénomène de dominance apicale et ne peuvent débourrer qu'une fois que cette dernière est levée, comme par exemple chez le pois (Cline, 1997). La suppression de l'apex caulinaire par décapitation libère les bourgeons axillaires de la paradormance et permet ainsi leur débourrement (Li et al., 1995). La décapitation engendre également une diminution des niveaux endogènes d'auxine bioactive (l'acide indole 3-acétique = AIA) (Morris et al., 2005). L'apport exogène d'auxine après la décapitation permet d'inhiber partiellement le débourrement des bourgeons axillaires (Li et al., 1995). L'auxine en provenance de l'apex participerait donc à inhiber le débourrement des bourgeons sous-jacents.

Le rôle des strigolactones a été mis en évidence chez des mutants de ramification dont les mutations affectent des enzymes de clivage des caroténoïdes : *rms5* et *rms1* (*ramosus*) chez le pois (Gomez-Roldan et al., 2008), *max3* et *max4* (*more axillary growth*) chez l'arabette et *d17* et *d10* (*dwarf*) chez le riz (Umehara et al., 2008). Ces mutants présentent un degré de ramification plus élevé que les plantes sauvages (Arumingtyas et al., 1992; Stirnberg et al., 2002; Sorefan et al., 2003; Ishikawa et al., 2005). Ce phénotype est corrélé à un niveau réduit de strigolactones chez *rms1*, *d17* et *d10*. L'application de strigolactones inhibe le débourrement chez ces mutants ainsi que chez les mutants *max3*, *max4*. Les gènes *RMS5/1*, *MAX3/4* et *D17/10* sont impliqués dans la voie de biosynthèse des strigolactones (Umehara et al., 2008; Gomez-Roldan et al., 2008).

L'application directe de cytokinines induit le débourrement des bourgeons axillaires (Sachs et Thimann, 1964). D'autre part, les niveaux endogènes de cytokinines dans le bourgeon augmentent lors des étapes précoces du débourrement (Turnbull et al., 1997).

Plusieurs théories ont émergé pour expliquer le rôle des différentes hormones dans les phénomènes de paradormance. L'hypothèse classique de la dominance apicale repose sur la transmission d'un signal inhibiteur du débourrement en provenance de l'apex caulinaire (Leyser, 2005; Dun et al., 2006). Dans cette théorie, l'influence inhibitrice du signal initial est capable de circuler de manière basipète pour inhiber le débourrement des bourgeons sous-jacents et acropète pour pénétrer dans le bourgeon ou le rameau inhibé. L'auxine serait le signal initial en provenance de l'apex. Cependant, son transport dans la tige est polarisé et principalement basipète. L'implication d'un ou plusieurs seconds messagers capables de circuler de manière acropète pour réguler le débourrement est donc nécessaire. Les cytokinines correspondent à l'un de ces messagers secondaires. En effet, l'auxine est capable de diminuer la synthèse de cytokinines dans la tige et son transport par le xylème depuis les racines. Elle inhiberait donc le débourrement en limitant le taux de cytokinines transporté jusqu'au bourgeon (Leyser, 2005). Les strigolactones correspondent à un autre messager secondaire de l'auxine. Des expériences de greffes réalisées entre des mutants de la voie de biosynthèse des strigolactones et des plantes sauvages chez l'arabette suggèrent que cette hormone circule de manière acropète (Turnbull et al., 2002; Booker et al., 2005). L'expression de *RMS1* est induite par l'auxine chez le pois, ce qui n'est pas le cas de son orthologue *MAX4* chez l'arabette (Sorefan et al., 2003). Dans le modèle classique de la dominance apicale, l'auxine en provenance de l'apex réduirait les niveaux de cytokinines et induirait celui des strigolactones arrivant au bourgeon pour inhiber son

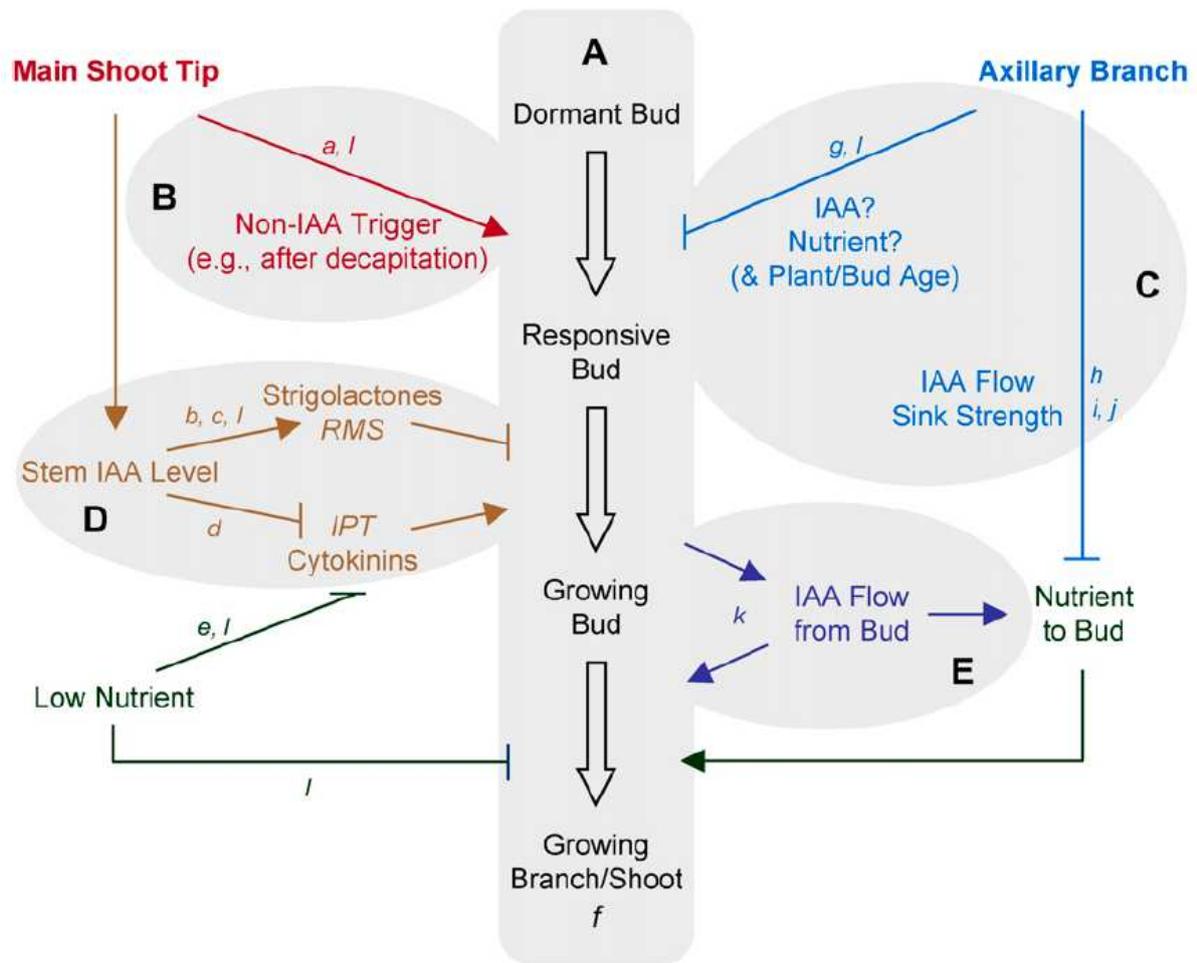


FIGURE 3 – Modèle de régulation du débourrement d'un bourgeon par les hormones et les nutriments proposé par Ferguson et Beveridge (2009). A. Le passage des bourgeons d'un état dormant à un état réceptif doit être déclenché afin qu'ils puissent percevoir les signaux de débourrement. B. La levée de dominance apicale par décapitation engendre un signal de déclenchement rapide qui est indépendant de l'auxine (IAA = AIA). C. Les bourgeons/tiges axillaires en croissance (inhibitions corrélatives) affectent la réponse des bourgeons à une réduction de strigolactones et réduit la disponibilité en nutriment du bourgeon nécessaires à sa croissance et son allongement. D. Les strigolactones inhibent le débourrement alors que les cytokinines (CK) le stimulent. Chez les plantes intactes, l'IAA inhibe le débourrement en maintenant des concentrations élevées de strigolactones et faibles de CK. E. La teneur en IAA d'un bourgeon réceptif augmente et est exportée dans la tige. Ceci permet le développement du système vasculaire du bourgeon et attire les nutriments nécessaires pour sa croissance. La croissance du bourgeon ou de la tige dépend ensuite de la disponibilité en nutriments.

débourrement. Toutefois, Morris et al. (2005) ont montré que la déplétion en auxine lors de la décapitation n'est pas le premier message à l'origine du débourrement. Lors de la décapitation, un message d'origine inconnue, circulant plus vite que l'auxine, permet au bourgeon d'initier son débourrement. Ce signal est capable de circuler dans des tiges "gainées" dont les cellules vivantes ont été tuées à l'aide de cire chaude, bloquant ainsi tout transport actif, y compris celui de l'auxine (Ferguson et Beveridge, 2009).

Une autre théorie, celle des flux d'auxine, envisage le phénomène de dominance apicale d'un autre point de vue (Dun et al., 2006; Ongaro et Leyser, 2008; Leyser, 2009). Cette hypothèse suggère que la dominance apicale soit contrôlée par les flux d'auxine dans la plante. Les bourgeons apicaux ou axillaires ne sont capables de débourrer que s'ils peuvent exporter l'auxine qu'ils produisent. L'auxine est exportée des cellules de manière polarisée grâce à l'activité des transporteurs d'efflux PIN (Pin-formed) (Bohn-Courseau, 2010). L'auxine en provenance du méristème apical serait responsable d'une saturation le flux d'auxine dans la tige et empêcherait ainsi le débourrement des bourgeons qui lui sont sous-jacents. Cette hypothèse est notamment confortée par le fait que le transport d'auxine est induit dans la tige des mutants *max* et que l'expression de *PINI* est induite dans la tige inflorescentielle basale de *max1* (Bennett et al., 2006). Les strigolactones réguleraient négativement l'exportation d'auxine dans la tige, induisant ainsi la dormance des bourgeons. Ferguson et Beveridge (2009) ont proposé un modèle intégrateur du rôle de l'auxine, des cytokinines et des strigolactones dans la régulation du débourrement prenant en compte la théorie des flux d'auxine (Figure 3).

Chez le rosier, les bourgeons axillaires sont sous l'influence de la dominance apicale ainsi que des inhibitions corrélatives par la feuille axillant le bourgeon et la portion de tige au dessus de ce dernier (Zieslin et Halevy, 1976a). Comme chez d'autres espèces, l'auxine est impliquée dans la dominance apicale (Sandrine Pelleschi-Travier, communication personnelle) et le rôle des strigolactones est en cours d'étude au sein des UMR GenHort (Génétique et Horticulture) et SAGAH.

2.4.2.3 La disponibilité en eau

Les teneurs en eau des bourgeons de bouleau augmentent au printemps, juste avant le débourrement (Rinne et al., 1994b). La teneur en eau libre est faible dans les bourgeons endodormants et elle augmente dans ceux prêts à débourrer chez le pommier (Faust et al., 1991) comme le pêcher (Erez et al., 1998). Chez les plantules de pois, la décapitation provoque une réduction du seuil de turgescence (valeur en dessous de laquelle la pression de turgescence n'engendre plus de déformation de la paroi) dans le bourgeon, concomitante à son débourrement (Kotov et Kotova, 2010). Elle pourrait donc être responsable d'une augmentation des capacités d'élongation cellulaire. La décapitation est également responsable d'une rapide diminution du potentiel osmotique des bourgeons, ce qui pourrait engendrer un flux d'eau de la tige vers le bourgeon. L'auxine en provenance de l'apex serait impliquée dans le contrôle du seuil de turgescence du bourgeon, mais pas dans celui de sa pression osmotique (Kotov et Kotova, 2010). Chez l'épicéa, le débourrement est précédé d'une augmentation de la vitesse de transport de l'eau dans la tige, de l'entrée d'eau dans les bourgeons, de la différenciation du protoxylème dans ces derniers et du transport de l'eau du protoxylème nouvellement formé vers le méristème, juste avant le débourrement (de Fay et al., 2000). Chez le rosier, la teneur en eau des bourgeons augmente lorsqu'ils sont exposés à la lumière dès 48 h après la décapitation (bourgeons en cours de débourrement). A l'obscurité (bourgeons dormants), elle augmente très légèrement après 24 h, puis reste stable (Girault, 2009). L'augmentation de la teneur en eau dans les bourgeons, coupl-

ée à l'induction de l'invertase pariétale et de la teneur en hexoses pourrait être en relation avec l'augmentation de la force puits des bourgeons.

2.4.2.4 La composition lipidique des membranes

Le débourrement s'accompagne de modifications de la composition lipidique du bourgeon. Chez le pommier, l'induction du débourrement par décapitation engendre une augmentation des teneurs en phospholipides (phosphatidylcholine, phosphatidyl-éthanolamine, phosphatidyl-glycérol et phosphatidylinositol) du bourgeon. Ces modifications ne sont pas observées chez les plantes décapitées traitées à l'auxine (Wang et Faust, 1995). L'induction du débourrement par divers régulateurs de croissance (thiadiazuron et nitroguanidines) engendre une augmentation des ratios (acides gras insaturés / acides gras saturés) et (campestrerol + stigmastérol / sitostérol), ainsi qu'une diminution du ratio (strérols libres / phospholipides) (Wang et Faust, 1988, 1989a,b). Il est largement reconnu que l'augmentation du degré d'insaturation des acides gras favorise la fluidité membranaire. Ces modifications pourraient donc être à l'origine d'une modulation du transport de l'eau, des hormones et des nutriments au sein du bourgeon.

2.5 Le transport des sucres

Les sucres solubles jouent un rôle essentiel dans la physiologie des végétaux. Ils constituent la principale source de carbone et d'énergie indispensables au métabolisme cellulaire et à la synthèse des parois végétales. Ils sont impliqués dans la résistance des plantes aux stress thermique (froid) (Yuanyuan et al., 2009) et hydrique (Bernacchia et Furinib, 2004) et dans la réparation locale de l'embolie hivernale (Decourteix et al., 2006). D'autre part, ils peuvent agir en tant que molécule signal (Sheen et al., 1999) et réguler divers processus développementaux, physiologiques et métaboliques chez les végétaux (Gibson, 2000, 2004, 2005).

Chez les végétaux, les sucres solubles sont produits par la photosynthèse ou la mobilisation des réserves (amidon, composants de la paroi,...). Ils sont ensuite transportés des tissus autotrophes qui les ont produits ("sources") vers les tissus hétérotrophes qui en ont besoin ("puits") (Ruiz-Medrano et al., 2001; van Bel, 2003). La forme majoritaire de sucre de transport chez les végétaux est le saccharose, un di-holoside non réducteur. Chez certaines espèces, il y a d'autres sucres mobiles tels que des oligosaccharides de la famille du raffinose (RFOs, ex : raffinose et stachyose) ou des sucres alcool (polyols, ex : mannitol et sorbitol) (Turgeon, 1996; Dinant, 2008). Une étude récente a démontré que les hexoses représentent la forme majoritaire de transport chez divers membres des Renonculacées et des Papavéracées (van Bel et Hess, 2008). Chez certaines Rosacées, les sucres mobiles sont principalement des polyols, bien que le saccharose soit également transporté. Cependant, ce n'est pas le cas chez le rosier, où la forme majoritaire de transport reste le saccharose (Zimmermann et Ziegler, 1975).

2.5.1 La répartition et le transport des sucres au sein de la plante

Au sein d'une plante les sucres sont répartis dynamiquement entre les organes "sources" et "puits", qui selon leur stade de développement peuvent se comporter tour à tour comme "puits" ou "source". Les jeunes feuilles en cours de développement sont des "puits", puis deviennent des "sources" dès lors qu'elles sont capables d'effectuer la photosynthèse et d'exporter les sucres néoformés (Turgeon, 1989). Il en va de même pour les organes de stockage ou de transport capables de remobiliser des réserves (Dinant, 2008). Chez les Angiospermes, le transport des sucres des organes "sources" vers les "puits" est assuré par le phloème, constitué

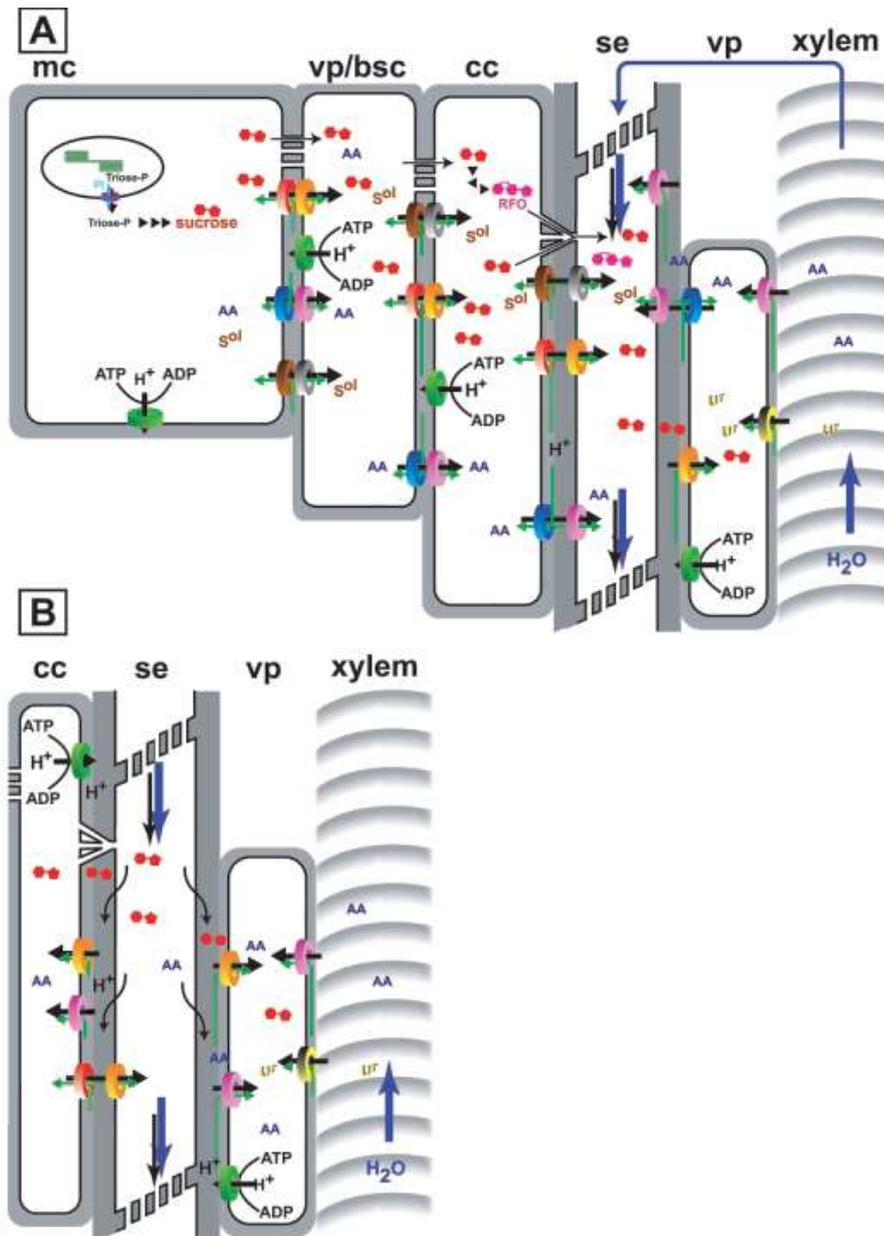


FIGURE 4 – Chargement du phloème et transport à longue distance des nutriments (Lalonde et al., 2003). A. **Chargement du phloème.** Le saccharose (rouge) synthétisé dans la feuille source est transféré dans le complexe cellules compagnes-élément criblé par voie symplasmique via les plasmodesmes ou par voie apoplasmique via des transporteurs. L'influx de saccharose est assuré par des co-transporteurs de saccharose/H⁺ (transporteurs oranges) alors que l'efflux est assuré par des anti-transporteurs de saccharose/H⁺ (transporteurs rouges) ou par diffusion facilitée (non représentée). Les sucres alcools (S^{ol}, marron) sont chargés activement dans le phloème par des transporteurs d'influx (gris) et d'efflux (marron). Cependant, la localisation exacte de ces transporteurs n'est pas bien connue. Le saccharose peut être chargé symplastiquement sous forme de RFOs (rose), synthétisés dans la cellule compagne. B. **Transport à longue distance des nutriments via le flux de masse.** Dans le phloème de transport, les nutriments qui sortent du phloème sont récupérés depuis l'apoplasme par des transporteurs. mc : cellule du mésophylle, vp/bsc : parenchyme vasculaire/cellules de la gaine, cc : cellule compagne, se : élément criblé.

d'un réseau de tubes criblés associées à des cellules compagnes (van Bel, 2003). Dans un premier temps, les sucres (ou assimilats) sont transférés des cellules du parenchyme phloémien vers le complexe cellules compagnes-tubes criblés des organes sources, cette étape correspond au chargement du phloème (Figure 4 A). Ils sont ensuite transportés vers les organes "puits" via le phénomène de flux de masse (Figure 4 B). Le flux de masse, décrit par Münch (1930), est généré par la pression hydrostatique résultant de la différence de pression osmotique entre les organes "sources" et "puits". Une fois dans les organes "puits", les sucres sont transférés du complexe tubes criblés-cellules compagnes vers les cellules du parenchyme phloémien, cette étape correspond au déchargement du phloème (Figure 5) (Dinant, 2008; Turgeon et Wolf, 2009).

2.5.2 La force puits d'un organe et la répartition des assimilats

D'après Ho (1988), la force puits d'un organe correspond à sa capacité à importer des assimilats. La force puits d'un organe peut être mesurée par la somme de carbone net accumulé dans l'organe et celui perdu par la respiration. En ne considérant que le carbone accumulé dans l'organe, on mesure uniquement la force puits apparente de celui-ci. La force puits d'un organe dépend principalement de sa capacité à attirer et recevoir les assimilats. Elle est en relation avec la taille et l'activité de l'organe puits. En fonction de leur activité (utilisation et répartition des assimilats importés) on définit des organes puits de "stockage" (ex : fruit, tige, tubercules, racines...) ou "d'utilisation" (ex : tissus méristématiques, jeunes feuilles, apex racinaire...). Dans les organes "d'utilisation", la plupart des assimilats importés sont utilisés pour la croissance et seule une petite partie d'entre eux sont stockés de manière transitoire. La principale activité métabolique de ces organes est la respiration. Le taux d'importation des assimilats est corrélé à leur taux de respiration (Ho, 1988). Le bourgeon axillaire en cours de débourrement est un organe puits constitué de tissus méristématiques et d'ébauches d'organes (feuilles et tiges) en croissance, il peut donc être considéré comme un organe puits "d'utilisation".

2.5.3 Le déchargement et le transport des sucres dans les organes puits

Le déchargement du phloème et le transport des sucres dans les organes puits peuvent s'effectuer selon 2 voies (Figure 5) (Oparka, 1990; Patrick, 1997; Lalonde et al., 2003) :

- **Symplasmique** : les sucres sont transférés d'une cellule à une autre au travers de connexions intercellulaires appelées plasmodesmes. Le transfert des sucres s'effectue selon le gradient de concentration entre les faisceaux conducteurs du phloème et les cellules puits. Il est régulé par la capacité de stockage et d'utilisation des réserves glucidiques des cellules puits.
- **Apoplasmique** : les sucres passent d'une cellule à une autre de manière indirecte, en traversant les membranes et circulant dans l'apoplasme. Le passage des sucres à travers les membranes plasmiques s'effectue par diffusion simple où de manière facilitée par des transporteurs de sucres. Le transfert des sucres par diffusion simple s'effectue selon le gradient de concentration en sucres, alors que celui impliquant les transporteurs peut s'opérer à l'encontre de ce même gradient.

Le déchargement du phloème et le transport des sucres qui s'ensuit s'effectue généralement par voie symplasmique (Figure 5 A) (Patrick, 1997). C'est notamment le cas dans les jeunes feuilles en cours de développement (Lalonde et al., 2003). Le phloème est, dans cet organe, in-

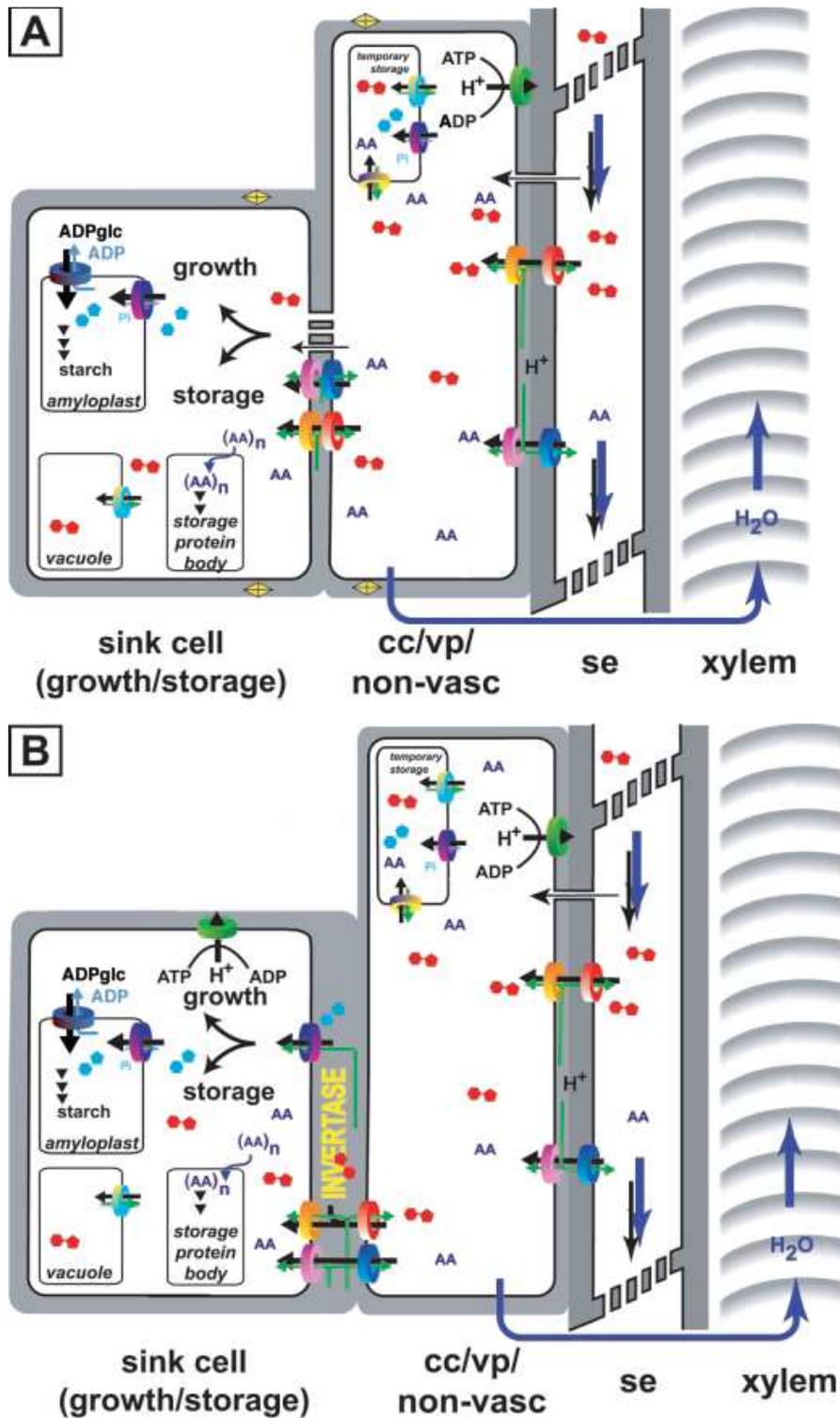


FIGURE 5 – Déchargement du phloème et transport qui s’ensuit (Lalonde et al., 2003). **A. Déchargement et transport par voie symplasmique.** Le saccharose (rouge) est transféré du complexe cellules compagnes-élément criblé aux cellules puits par voie symplasmique via les plasmodesmes. **B. Déchargement et transport par voie apoplasique.** Le saccharose est expoté dans l’apoplasme par des anti-transporteurs de saccharose/H⁺ (transporteurs rouges) ou par diffusion facilitée (non représentée). Il est ensuite importé par les cellules puits depuis l’apoplasme par des co-transporteurs de saccharose/H⁺ (transporteurs oranges) ou par diffusion facilitée. Le saccharose peut également être hydrolysé en hexoses (bleu clair) dans l’apoplasme par une invertase pariétale. Dans ce cas, les hexoses sont importés par les cellules puits par des co-transporteurs d’hexoses/H⁺ (transporteurs bleus/violet). se : élément criblé, cc/vp/non-vasc : cellule compagne/parenchyme vasculaire/non vasculaire.

terconnecté aux tissus non phloémiens par des plasmodesmes (Ding et al., 1988; Haupt et al., 2001). L'utilisation de traceurs fluorescents imperméable aux membranes (GFP : green fluorescent protein et CF : carboxyfluorescein) a permis de montrer que ces plasmodesmes sont fonctionnels et permettent le déchargement symplasmique des assimilats (Roberts et al., 1997; Imlau et al., 1999; Oparka et al., 1999; Haupt et al., 2001). De plus, le PCMBMS (un inhibiteur des groupements thiols qui affecte l'activité des transporteurs de saccharose) n'a aucun effet sur le déchargement des produits de la photosynthèse (Schmalstig et Geiger, 1985; Turgeon, 1987).

Cependant, dans certains cas, le transport symplasmique des sucres au sein des tissus puits est interrompu par une étape apoplasmique (Figure 5 B). C'est généralement le cas lorsque le transport des assimilats a lieu à l'interface entre les génomes de différents individus (relations biotrophiques : hôte/parasite, tissus maternels/filiaux) et dans des organes qui accumulent des sucres à forte concentration (Patrick, 1997).

Lorsqu'il est transporté par voie apoplasmique, le saccharose peut être déchargé dans l'apoplasme par simple diffusion ou via l'activité de transporteurs de saccharose (Patrick, 1997; Lalonde et al., 2003). Après avoir circulé dans l'apoplasme, il peut directement être importé dans les cellules puits par des transporteurs de saccharose (Lemoine, 2000) ou par diffusion facilitée (Lalonde et al., 2003) ou être clivé en hexoses (glucose + fructose) par l'activité d'une invertase pariétale (Strum et Tang, 1999). Dans le dernier cas, les hexoses produits sont importés dans les cellules puits par des transporteurs de monosaccharides (Büttner et Sauer, 2000). Une fois dans les cellules puits, le saccharose peut être clivé en hexoses par l'activité d'invertases (cytoplasmique ou vacuolaire) ou de la saccharose synthase (enzyme cytoplasmique catalysant la transformation réversible du saccharose en UDP-glucose + fructose) (Strum et Tang, 1999; Lytovchenko et al., 2007).

Les voies de déchargement et de transport des sucres au sein des bourgeons végétatifs en cours de développement n'ont fait l'objet que de peu d'études. Chez l'arabette, l'utilisation d'un traceur fluorescent montre que les connexions symplasmiques (plasmodesmes fonctionnels) entre le phloème et le méristème apical caulinaire varient au cours du développement. Les jeunes méristèmes apicaux caulinaires (cultivés 25 jours en condition de jours courts, ou comprenant moins de 12 feuilles visibles) sont symplasmiquement isolés du phloème. A partir de 27 jours de culture en conditions de jours courts, le méristème est connecté au phloème par le symplasma, jusqu'au virage floral et la production des premières pièces florales visibles (40 jours de culture en condition de jours courts, plantes comprenant au moins 18 feuilles visibles) après quoi ce n'est plus le cas (Gisel et al., 1999). Une étude similaire réalisée chez le tubercule de pomme de terre (Viola et al., 2007) montre que les bourgeons dormants sont symplasmiquement isolés du tubercule. Leur débourrement est concomitant à la mise en place de connexions symplasmiques entre le tubercule et le bourgeon et à l'accumulation de sucres (saccharose et amidon principalement) dans le bourgeon. En revanche, l'incorporation de glucose radiomarqué est identique entre les bourgeons dormants et ceux en cours de débourrement. Le déchargement du saccharose nécessaire au débourrement des bourgeons de tubercule de pomme de terre s'effectue donc par voie symplasmique. Chez le pêcher, l'approvisionnement en sucre du bourgeon végétatif lors des étapes précoces du débourrement implique quant à lui l'importation d'hexoses par voie apoplasmique (Aue et al., 1999; Gévaudant et al., 2001; Maurel et al., 2004).

L'approvisionnement en sucre des bourgeons végétatifs pourrait donc faire intervenir des voies symplasmiques et/ou apoplasmiques de déchargement et de transport des sucres solubles en fonction du stade de développement et/ou de l'espèce considérée. Cependant, les voies impl-

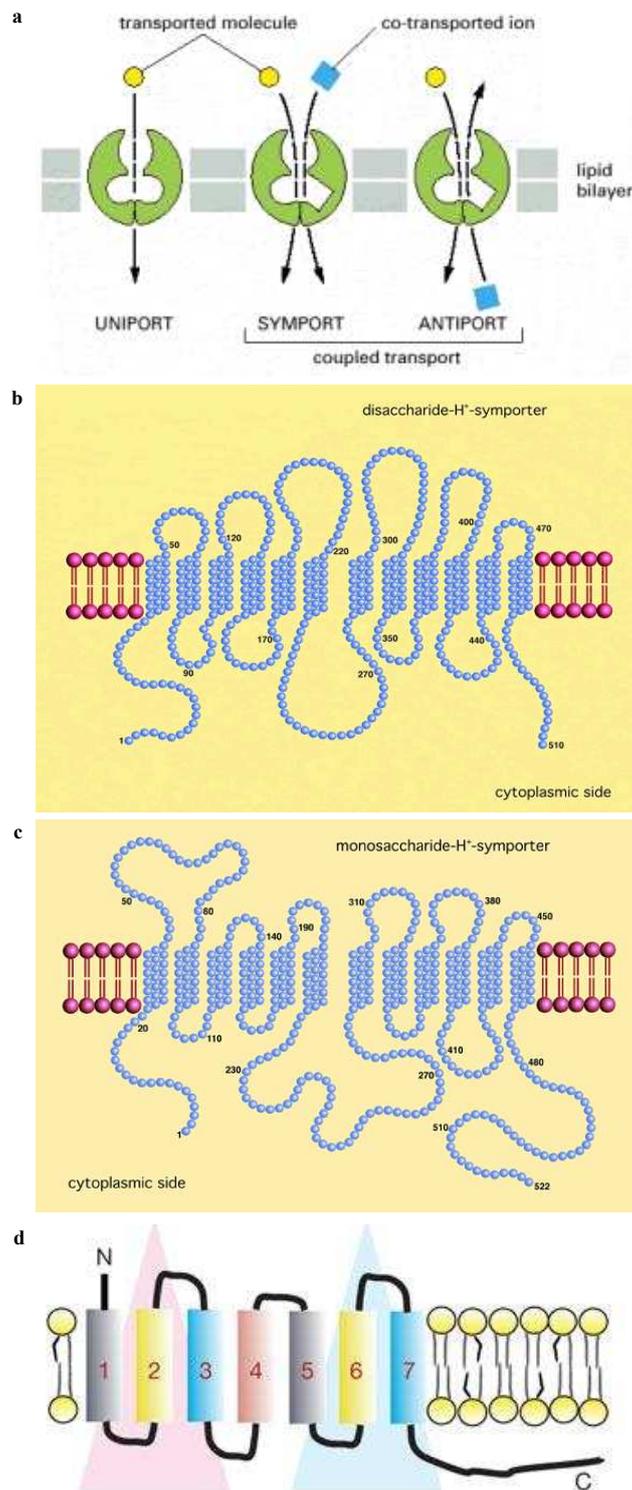


FIGURE 6 – Structure et fonctionnement des transporteurs de sucre. (a) Mode de fonctionnement des différents types de transporteurs (Alberts et al., 2002). Les facilitateurs (uniporters) permettent la diffusion passive des sucres au travers des membranes. Les anti-transporteurs (antiporters) et co-transporteurs (symporters) permettent le transport actif secondaire des sucres au travers des membranes. Le transport d’une molécule de sucre est alors couplée à celle d’un proton et dépend de la force protonomotrice générée de manière active par les ATPases. **Modèle de structure secondaire d’un transporteur de disaccharide (b), d’un transporteur de monosaccharide (c) et d’un transporteur SWEET chez *Arabidopsis thaliana* (TPer, 2010; Chen et al., 2010).** La plupart des transporteurs de sucre chez les végétaux (b et c) sont constitués de 12 domaines transmembranaires reliés entre eux par des domaines extra- et intracellulaires, des extrémités N- et C-terminales cytoplasmiques et une grande boucle cytoplasmique centrale entre les domaines transmembranaires VI et VII. Les SWEET transporteurs récemment isolés sont quant à eux constitués de 7 domaines transmembranaires en configuration 3+1+3.

iquées dans le déchargement et le transport des sucres chez le rosier n'ont pas encore été étudiées.

2.5.4 Les transporteurs de sucres

Il s'agit de protéines membranaires catalysant le transport des sucres au travers des membranes. La majorité des transporteurs de sucres caractérisés chez les végétaux appartiennent à la Superfamille des Facilitateurs Majeurs (MFS : Major Facilitator Superfamily) (Büttner, 2007; Kühn et Grof, 2010), exceptés les SWEET, nouvellement caractérisés par Chen et al. (2010). La MFS est l'une des deux plus grandes superfamilles de transporteurs chez les êtres vivants (Saier, 2000a). Elle regroupe des facilitateurs (uniporters), des anti-transporteurs (antiporters) et des co-transporteurs (symporters) (Saier, 2000b). Les transporteurs de sucres appartiennent à l'une de ces 3 catégories (Figure 6 a). Les facilitateurs permettent une diffusion passive des sucres, selon le gradient de concentration. Les anti- et co-transporteurs catalysent quant à eux le transport actif secondaire des sucres. Le transport d'une molécule de sucre est alors catalysé par l'anti- ou le co-transport d'un cation monovalent (H^+ ou Na^+) (Saier, 2000a). Chez les plantes, le transport actif des sucres dépend du gradient électrochimique de H^+ , généré par l'activité de pompes à protons (ATPases) (Delrot et al., 2001).

Chez les végétaux, il existe des transporteurs de disaccharides (DST : DiSaccharide Transporter), également nommés transporteurs de saccharose (SUC : SUCrose Carrier, SUT : SUCrose Transporter et SUF : SUCrose Facilitator) (Figure 6 b) et des transporteurs de monosaccharides et de polyols (MST-like : MonoSaccharide Transporter-like), appartenant tous deux à la MFS (Figure 6 c). La plupart de ces transporteurs sont constitués de 12 domaines transmembranaires, dont les 6 premiers présentent des homologies de séquence avec les 6 derniers (Saier, 2000a). Ils présentent généralement des extrémités N- et C-terminales cytoplasmiques et une grande boucle cytoplasmique centrale (Delrot et al., 2001). Les SUCs et MSTs partagent des caractéristiques structurales communes, mais ont cependant des séquences protéiques très différentes (Williams et al., 2000).

Chen et al. (2010) ont récemment mis en évidence l'existence d'une nouvelle famille de transporteurs de sucres, les SWEET, présents chez les végétaux (arabette et riz) et les métazoaires (nématode, ascidie, souris et Homme). Ceux caractérisés chez les végétaux sont des facilitateurs catalysant l'influx ainsi que l'efflux de sucre au travers des membranes. Ce sont de petites protéines constituées de 7 domaines transmembranaires, dont la structure dériverait de la duplication d'un polypeptide à 3 domaines transmembranaires (1-3 et 5-7) fusionnés via le 4^{ème} domaine en une configuration 3+1+3 (Figure 6 d). Ces transporteurs présentent une extrémité C-terminale cytoplasmique et une extrémité N-terminale située sur la face opposée de la membrane (Chen et al., 2010).

2.5.4.1 Les transporteurs de saccharose

Les transporteurs de saccharose catalysent le transport actif ou passif du saccharose au travers des membranes. Le premier transporteur de saccharose (SoSUT1, *Spinacea oleacera* SUCrose Transporter 1) a été isolé chez l'épinard par Riesmeier et al. (1992). L'ADNc correspondant à *SoSUT1* a été isolé à partir d'une banque ADNc de feuilles d'épinard par complémentation fonctionnelle de levures déficientes pour leur invertase pariétale (YSH INV8, YSH SUSY7). La majorité des transporteurs de saccharose identifiés à ce jour sont des co-transporteurs de saccha-

rose/H⁺ (Kühn et Grof, 2010), exceptés les facilitateurs (SUF) caractérisés chez le pois et le haricot (Zhou et al., 2007). Les SUCs sont généralement très spécifiques du saccharose, même si certains d'entre eux sont capables de transporter d'autres substrats. AtSUC2 est ainsi capable de transporter divers α et β glucosides dont le maltose (Chandran et al., 2003). AtSUC5 et PmSUC2 sont eux capables de transporter la vitamine H (biotine) (Ludwig et al., 2000). Des travaux réalisés sur divers SUCs montrent que le maltose peut inhiber le transport de saccharose (Meyer et al., 2000; Ludwig et al., 2000; Barth et al., 2003; Tang et al., 2010). L'activité des co-transporteurs de saccharose/H⁺ est fortement inhibée par les protonophores (CCCP et DNP), les inhibiteurs de la production d'ATP (antimycine et arsenate), les inhibiteurs des groupements thiols (PCMBs et NEM) et les inhibiteurs d'histidine (DEPC) (Lemoine, 2000).

Les transporteurs de saccharose sont codés par une famille multigénique dont on connaît neuf isoformes chez l'arabette (Sauer et Stolz, 1994; Barker et al., 2000; Ludwig et al., 2000; Meyer et al., 2000, 2004; Weise et al., 2000; Sauer et al., 2004), sept chez l'hévéa (Yang et al., 2007; Dusotoit-Coucaud et al., 2009), cinq chez le riz (Hirose et al., 1997; Takeda et al., 2001; Aoki et al., 2003), quatre chez la vigne (Davies et al., 1999; Ageorges et al., 2000), trois chez la tomate (Barker et al., 2000; Weise et al., 2000) et deux chez le tabac (Burkle et al., 1998; Lemoine et al., 1999). Au sein d'une même espèce, les différentes isoformes de transporteurs de saccharose peuvent avoir des affinités, des localisations tissulaires et cellulaires, ainsi que des fonctions physiologiques différentes et complémentaires (Sauer, 2007).

Les analyses phylogéniques permettent de classer les transporteurs de saccharose en 3 à 5 sous-familles, groupes ou clades (Kühn, 2003; Sauer, 2007; Kühn et Grof, 2010). Selon la classification établie par Sauer (2007), les transporteurs de saccharose sont répartis en 4 groupes :

- **Groupe 1** : ce sont des transporteurs de saccharose à forte affinité localisés dans la membrane plasmique de Monocotylédones. Ils catalysent principalement l'absorption de saccharose dans le phloème et les cellules puits. Ce groupe a récemment été divisé en 2 clades (SUT3 et SUT5) dans la classification de Kühn et Grof (2010), cependant l'auteur n'a fait aucune distinction fonctionnelle entre les membres de ces clades.
- **Groupe 2** : rassemble des transporteurs de saccharose à forte affinité localisés dans la membrane plasmique de Dicotylédones. Ces transporteurs sont responsables du chargement du phloème et de l'importation du saccharose dans différents tissus puits, comme leur homologues du Groupe 1 chez les Monocotylédones. Ils correspondent aux transporteurs du clade SUT1 dans la classification de Kühn et Grof (2010).
- **Groupe 3** : correspond à des transporteurs de saccharose à faible affinité présentant une extension de leur extrémité N-terminale et de la boucle cytoplasmique centrale. Ils ont été localisés dans les membranes plasmiques du complexe cellules compagnes-tubes criblés chez la tomate (Barker et al., 2000), le plantain (Barth et al., 2003) et l'arabette (Meyer et al., 2004). Chez cette dernière ils sont exprimés dans divers tissus puits, où ils ont été proposés comme responsables de l'importation de saccharose. Les transporteurs de ce groupe présentent des caractéristiques communes aux senseurs de sucre (SNF3 et RGT2) chez la levure (Barker et al., 2000), mais aucune activité de perception de sucre n'a été démontrée à ce jour (Sauer, 2007). Ces transporteurs correspondent à ceux du clade SUT2 dans la dernière classification (Kühn et Grof, 2010).
- **Groupe 4** : comprend des transporteurs de saccharose à faible affinité. Ils ont initialement été proposés comme des transporteurs de la membrane plasmique d'après leur expression hétérologue chez la levure (AtSUT4, StSUT4 et HvSUT2) et l'immunolocalisation (St-

SUT4 et LeSUT4) de certains d'entre eux dans le complexe cellules compagnes-tubes criblés (Weise et al., 2000; Weschke et al., 2000). Cependant, de récents travaux montrent que plusieurs d'entre eux (AtSUT4, HvSUT2 et LjSUT4) seraient localisés dans le tonoplaste (Endler et al., 2006; Reinders et al., 2008). Les transporteurs de ce groupe représentent donc les transporteurs de saccharose tonoplastiques. Leur localisation indique qu'ils pourraient participer à la compartimentation cellulaire du saccharose et par conséquent à la régulation des pressions osmotiques. Ces transporteurs correspondent à ceux du clade SUT4 dans la dernière classification (Kühn et Grof, 2010).

Les facilitateurs de saccharose (SUFs) isolés chez le haricot et le pois présentent des caractéristiques cinétiques très différentes des autres transporteurs de saccharose mais en sont très proches sur le plan phylogénétique. Ils présentent notamment une affinité extrêmement faible pour le saccharose et leur activité n'est pas affectée par l'antimycine, le CCCP ou le DEPC (Zhou et al., 2007). Cependant, PsSUF1 et PvSUF1 peuvent être classés dans le groupe 2 et PsSUF4 dans le groupe 4 des transporteurs de saccharose présentés ci-dessus.

La plupart des transporteurs de saccharose sont exprimés dans divers tissus puits où ils peuvent avoir différentes fonctions (Kühn, 2003; Sauer, 2007; Kühn et Grof, 2010). Ils sont notamment présents dans les structures participant à la reproduction. AtSUC1, dont les ARNm s'accumulent dans les tissus connectifs de l'anthère, a été proposé pour participer à la déhiscence de cette dernière chez l'arabette (Stadler et al., 1999). Les transporteurs NtSUT3 (tabac), LeSUT2 (tomate) et AtSUC1 (arabette) sont exprimés dans le grain de pollen et participent à son développement (Lemoine et al., 1999; Hackel et al., 2006; Sivitz et al., 2008).

Les profils d'expression des transporteurs de saccharose dans la graine en formation indiquent que ces derniers jouent un rôle important dans les échanges entre les tissus maternels et filiaux nécessaires à son développement. Chez la fève, le pois et le haricot, les transporteurs VfSUT1 (Weber et al., 1997), PsSUT1, PsSUF1, PsSUF4 (Tegeder et al., 1999; Zhou et al., 2007), ainsi que PvSUT1 et PvSUF1 (Zhou et al., 2007) sont exprimés dans les téguments de la graine en cours de développement. Leur expression est notamment localisée dans les cellules permettant l'efflux de saccharose des téguments de la graine vers l'embryon (Weber et al., 1997; Zhou et al., 2007). Les facilitateurs PsSUF1, PsSUF4 et PvSUF1 ont été proposés comme des acteurs de l'efflux de saccharose des téguments de la graine vers l'apoplasme de cette dernière. VfSUT1, PsSUT1 et PvSUT1 sont des co-transporteurs de saccharose/H⁺, leur rôle dans les téguments de la graine est donc plus difficile à interpréter. *VfSUT1* et *PsSUT1* sont également exprimés dans les cotylédons de l'embryon, suggérant leur implication dans le stockage des réserves (Weber et al., 1997; Tegeder et al., 1999). Chez l'orge, *HvSUT1* est exprimé dans le jeune caryopse en formation. L'induction de *HvSUT1* juste après le début de l'accumulation d'amidon dans l'albumen coïncide avec une augmentation de la quantité de saccharose et de l'expression de la saccharose synthase (Weschke et al., 2000). Chez l'arabette, des analyses du taux de transcrite et de l'activité du promoteur d'*AtSUC5* montrent que ce gène est principalement exprimé dans l'albumen de la graine (tissus filiaux) lors des étapes précoces de son développement. Les embryons des mutants *AtSUC5* présentent un retard de développement, suggérant un rôle pour *AtSUC5* dans la nutrition des tissus filiaux de la graine lors des étapes précoces de son développement (Baud et al., 2005).

Certains transporteurs de saccharose sont impliqués dans la formation et la maturation du fruit. Les tomates transgéniques *LeSUT1* antisens et *LeSUT2* antisens sont incapables de produire des baies normales. Chez les tomates *LeSUT2* antisens, la réduction du rendement en fruit pourrait être une conséquence des problèmes de pollinisation causés par l'inhibition de l'expres-

ssion de *LeSUT2* (Hackel et al., 2006). Chez la baie de raisin, *VvSUC27* est fortement exprimé lors des étapes précoces de la formation du fruit jusqu'à la véraison, puis son expression est rapidement inhibée. A contrario, *VvSUC11* et *VvSUC12* sont exprimés en permanence dans la baie en cours de formation mais leur expression est induite suite à la véraison (Davies et al., 1999). *VvSUT1* est également présent dans la baie à tous les stades de sa formation, mais il s'y accumule plus fortement juste avant la véraison (Ageorges et al., 2000). Chez l'arabette, la protéine *AtSUC3* est présente dans une couche subépidermique des carpelles importante pour la déhiscence de la silique, ce qui suggère son implication dans ce processus (Meyer et al., 2000).

Des transporteurs de saccharose participeraient également à l'importation de saccharose par les cellules laticifères de l'hévéa, nécessaire à la production de latex. Cette importation est assurée par *HbSUT1A* et *HbSUT1B* chez les arbres non exploités et par *HbSUT3* chez les arbres exploités (Dusotoit-Coucaud et al., 2009; Tang et al., 2010).

2.5.4.2 Les transporteurs de monosaccharides et de polyols

Les transporteurs de monosaccharides et de polyols (MST-like) catalysent le transport de divers sucres et molécules organiques (hexoses, polyols, inositol, pentoses et tetroses) au travers des membranes (Büttner, 2007). Le premier transporteur de monosaccharide identifié chez les végétaux est le transporteur d'hexose *CkHUP1* (Hexose Uptake Protein 1) exprimé chez l'algue verte unicellulaire *Chorella kessleri*, qui peut se développer en conditions autotrophe ou hétérotrophe. Dans le second cas, le glucose est sa seule source de carbone, sa capacité à importer ce sucre est alors induite plus de 200 fois par rapport à la condition autotrophe. L'ADNc de *CkHUP1* a été isolé par criblage différentiel entre des cellules cultivées en conditions autotrophes et hétérotrophes (Sauer et Tanner, 1989). Tous les transporteurs de monosaccharides caractérisés à ce jour sont des co-transporteurs de monosaccharides/ H^+ . Ils sont codés par une grande famille multigénique : l'arabette compterait cinquante trois gènes codant potentiellement pour des transporteurs de monosaccharides, de polyols et d'inositol (Büttner, 2007) contre neufs codant potentiellement pour des transporteurs de saccharose (Sauer, 2007). Un grand nombre de transporteurs potentiels de monosaccharides ont également été identifiés chez d'autres espèces. Une analyse des banques ESTs a notamment permis d'identifier soixante-deux séquences contigues de MST-like exprimés chez le pin *Pinus taeda*, quarante-six chez le maïs, vingt-quatre chez la tomate et dix-huit chez la mousse *Physcomitrella patens* (Johnson et al., 2006). Huit MSTs ont également été identifiés chez le ricin (Weig et al., 1994), le riz (Toyofuku et al., 2000; Takeda et al., 2001; Wang et al., 2007, 2008; Cho et al., 2010) et la vigne (Fillion et al., 1999; Vignault et al., 2005; Conde et al., 2006).

La famille des MST(-like) est composée de sept sous-familles chez l'arabette (Johnson et al., 2006; Büttner, 2007) :

- **Sous-famille des STP (Sugar Transport Protein)** : cette sous famille est constituée de quatorze membres. Tous ceux caractérisés sont des co-transporteurs d'hexose/ H^+ du plasmalemme. A l'exception d'*AtSTP3*, ils présentent tous une forte affinité pour les hexoses. Ils catalysent l'influx d'hexoses de l'apoplasme vers la cellule. La plupart d'entre eux sont exprimés dans divers tissus puits : *AtSTP1* (Sherson et al., 2000), *AtSTP2* (Truernit et al., 1999), *AtSTP4* (Truernit et al., 1996), *AtSTP6* (Scholz-Starke et al., 2003), *AtSTP9* (Schneidereit et al., 2003), *AtSTP11* (Schneidereit et al., 2005) et *AtSTP13* (Norholm et al., 2006). Les transporteurs *AtSTP1* (Stadler et al., 2003) et *AtSTP3* (Büttner et al., 2000) sont également présents dans des organes sources. Les STPs sont les transporteurs de monosaccharides dont la fonction a le plus été étudiée.

- **Sous-famille des VGT-like (Vacuolar Glucose Transporter-like) ou XyloseTP homologs** : deux des trois membres de cette sous-famille (*AtVGT1* et *AtVGT2*) sont localisés dans le tonoplaste. *AtVGT1* catalyse le transport actif de glucose, il est également capable de transporter le fructose mais pas le xylitol. Il est fortement exprimé dans le grain de pollen, mais il est également présent dans divers organes (apex racinaire, graine, feuilles, tige...) excepté dans la racine (Aluri et Büttner, 2007). Le troisième membre de cette sous-famille possède une extension N-terminale portant un signal d'adressage aux plastes, il pourrait donc être localisé dans la membrane chloroplastique (Büttner, 2007).

- **Sous-famille des TMT (Tonoplast Monosaccharide Transporter)** : les trois membres de cette famille présentent une extension de leur boucle cytoplasmique centrale. *AtTMT1* et *AtTMT2* sont localisés dans le tonoplaste (Carter et al., 2004; Wormit et al., 2006). L'utilisation de mutants démontre qu'*AtTMT1* est responsable de plus de la moitié de l'importation active de glucose vacuolaire chez les cellules du mésophylle exposées au froid. Dans ces conditions *AtTMT2* et *AtTMT3* ne participeraient pas à l'importation de glucose. *AtTMT1* et *AtTMT2* sont exprimés dans tous les organes testés, cependant *AtTMT1* est préférentiellement exprimé dans les feuilles et *AtTMT2* dans la tige (Wormit et al., 2006). Leurs homologues *OsTMT1* et *OsTMT2* chez le riz sont également localisés dans le tonoplaste où *OsMST1* est capable d'assurer l'importation de glucose vacuolaire lorsqu'il est exprimé chez le triple mutant *At(tmt1-2-3)* (Cho et al., 2010).

- **Sous-famille des pGlcT/SGB1 (Plastidic Glucose Transporter/Suppressor of G Protein Beta1)** : cette sous famille comprend quatre membres. *SopGlcT*, l'homologue d'*AtpGlcT* chez l'épinard est un transporteur de glucose potentiel localisé dans la membrane interne des chloroplastes. Chez le tabac, son homologue est principalement exprimé dans les feuilles subissant la transition puits/source, ainsi que dans les feuilles sources et le bouton floral (Weber et al., 2000). Les auteurs ont proposé une implication de ce transporteur dans l'exportation du glucose dérivé de la dégradation des réserves amylacées stockées transitoirement dans les chloroplastes. *AtSGB1* est un transporteur d'hexose potentiel localisé dans l'appareil de Golgi (Wang et Li, 2006). Les propriétés cinétiques et le rôle exact de ces transporteurs dans la physiologie de la plante ne sont pas connus.

- **Sous-famille des ERD6-like (Early-Responsive to Dehydration-like)** : cette sous famille est celle qui regroupe le plus grand nombre de transporteurs potentiels de monosaccharides (dix-neuf). Cependant, seul trois d'entre eux ont été étudiés : *AtERD6*, *AtSFP1* (*Arabidopsis thaliana* Sugar-porter Family Protein) et *AtSFP2* (Büttner, 2007). *AtERD6* est induit par la deshydratation et le froid (Kiyosue et al., 1998). Il présente de fortes homologies avec les GLUT des mammifères, qui sont des facilitateurs de glucose (Büttner, 2007). Son expression hétérologue chez la levure n'a pas permis de mettre en évidence une quelconque activité de transport (Kiyosue et al., 1998). Son homologue chez la betterave est localisé dans le tonoplaste et il ne présente aucune activité de transport lorsqu'il est exprimé chez la levure (Chiou et Bush, 1996). D'après Büttner (2007), plusieurs membres de cette sous-famille présenteraient une localisation similaire. *AtSFP1* est exprimé dans les stomates et l'extrémité des cotylédons chez les jeunes plantules. Son expression est fortement induite dans les feuilles sénescents et son induction est couplée à une accumulation de monosaccharides. Ce résultat indique qu'*AtSFP1* participe à l'importation de monosaccharides dans les feuilles sénescents (Quirino et al., 2001). *AtSFP2* est exprimé dans tous les organes testés à un niveau relativement faible où il est principalement présent dans les faisceaux conducteurs. Il est également fortement induit dans l'apex caulinaire de la jeune plantule (Quirino et al., 2001). Büttner (2007) a proposé que

ces transporteurs interviennent dans l'efflux de sucre vacuolaire en conditions de ré-allocation importante des carbohydrates.

- **Sous-famille des PLT (Polyol Transporter) :** cette sous-famille comprend six membres. Les AtPLT caractérisés sont tous des co-transporteurs de polyols/monosaccharides/H⁺ capables de transporter divers substrats dont le sorbitol, le xylitol, le glucose, le fructose, le xylose et le galactose. Ils ont récemment été renommés PMT (Polyol/Monosaccharide transporter) pour cette raison (Klepek et al., 2010). Chez l'arabette, les isoformes 1, 2 et 5 sont localisés dans la membrane plasmique (Klepek et al., 2005, 2010). AtPLT5 transporte préférentiellement le sorbitol et le glucose. Il est principalement exprimé dans les tissus puits (zone d'élongation de la racine, tige inflorescentielle et plusieurs structures florales) (Klepek et al., 2005; Reinders et al., 2005). AtPMT1 et AtPMT2 transportent préférentiellement le xylitol et le fructose. Ils sont spécifiquement exprimés dans les tissus puits (grain de pollen, tube pollinique, hydathodes et jeunes cellules du xylème) (Klepek et al., 2010).
- **Sous-famille des INT (Inositol Transporter) :** cette sous famille comprend quatre membres. AtINT2 et AtINT4 sont des co-transporteur de myo-inositol/H⁺ localisés dans la membrane plasmique. AtINT4 présente une forte affinité pour le myo-inositol, plus importante que celle d'AtINT2 (Schneider et al., 2006, 2007). D'après Schneider et al. (2007), AtINT1 serait un transporteur d'inositol tonoplastique. *AtINT3* code pour une protéine tronquée de 182 acides aminés ne présentant que 5 domaines transmembranaires potentiels. *AtINT2* est modérément exprimé dans le tapetum de l'anthère, les tissus vasculaires et le mésophylle des feuilles (Schneider et al., 2007). *AtINT4* est quant à lui fortement exprimé dans le grain de pollen et les cellules compagnes du phloème (Schneider et al., 2006). Les simples et doubles mutants d'insertion *Atint2.1*, *Atint4.2* et *Atint2.1/Atint4.2* ne présentent aucune différence de croissance, de floraison ou d'accumulation de carbohydrates (myo-inositol, glucose, fructose et saccharose) dans les feuilles par rapport aux plantes sauvages (Schneider et al., 2006, 2007).

Des homologues de MST(-like) appartenant à chacune des sept sous-familles identifiés chez l'arabette ont été isolés chez plusieurs espèces de plantes vasculaires ainsi que chez l'algue unicellulaire *Chorella kessleri*. Les sept sous-familles de MST(-like) sont donc anciennes sur le plan évolutif et elles dérivent toutes d'un ancêtre commun (Johnson et al., 2006). La diversité de transporteurs de monosaccharides rencontrée au sein des différentes espèces étudiées souligne leur importance dans la physiologie des plantes.

La majorité des transporteurs de monosaccharides caractérisés à ce jour sont exprimés dans les tissus puits (Johnson et al., 2006). Ils jouent notamment un rôle primordial dans la formation et le développement du grain de pollen. AtSTP2 est présent uniquement dans grain de pollen, lors des étapes précoces de sa formation (Truernit et al., 1999). Les auteurs suggèrent qu'il est impliqué dans l'importation du glucose résultant de la dégradation de la callose lors de la maturation du pollen. *AtSTP6* est exprimé spécifiquement dans le pollen, lors des stades tardifs de son développement. La viabilité et le développement du pollen, ainsi que la double fécondation de l'ovule et la production de graines sont inchangées chez les mutants *Atstp6* par rapport aux plantes sauvages (Scholz-Starke et al., 2003). Son rôle dans la physiologie du pollen reste donc incompris. La protéine AtSTP9 est présente uniquement dans le pollen mature en faible quantité et dans le tube pollinique en grande quantité (Schneidereit et al., 2003). Les auteurs suggèrent une implication de ce transporteur un rôle dans la germination du pollen et/ou la croissance du tube pollinique. Il en est de même pour AtSTP11, présent exclusivement dans le tube pollinique (Schneidereit et al., 2005).

La formation des fruits charnus tels que les baies est un processus qui nécessite l'importation d'une grande quantité de sucres et implique l'activité de transporteurs de monosaccharides. *VvHT1*, *VvHT2* et *VvHT3* sont exprimés dans la baie de raisin à différents stades de sa formation (de manière légèrement différente selon le cépage considéré) (Fillion et al., 1999; Hayes et al., 2007). *VvHT1* est un transporteur de glucose à forte affinité. Il est localisé dans la membrane plasmique de l'interface entre les tubes criblés et les cellules compagnes et dans celle des cellules de la pulpe proche des faisceaux conducteurs. Il participerait à l'importation de monosaccharides nécessaires aux divisions et à la croissance cellulaire lors des étapes précoces de la formation de la baie (Vignault et al., 2005). Les gènes *VvHT2* et *VvHT3* sont exprimés dans la baie lors des étapes précoces et tardives de son développement. Ils pourraient également jouer un rôle dans l'importation et l'accumulation de sucre dans les cellules de la pulpe des baies. Cependant, aucune activité de transport n'a pu être démontrée pour *VvHT3* en système hétérologue et celle de *VvHT2* n'a pas été testée (Hayes et al., 2007). Chez l'ananas, des transporteurs potentiels d'hexoses (*AcMST1* et *AcMST2*) sont exprimés dans l'infrutescence (accumulation de transcrits) (Antony et al., 2008). Des transporteurs de polyols participent également à la formation du fruit chez certaines Rosacées. Les transporteurs de sorbitol du cerisier (*PcSOT1* et *PcSOT2*) et du pommier (*MdSOT1* et *MdSOT2*) sont exprimés dans le fruit où ils jouent un rôle dans l'accumulation de sucre (Gao et al., 2003, 2005).

Les transporteurs de monosaccharides sont indispensables à la formation et à la germination de la graine. Chez la fève, les transcrits du transporteur d'hexoses *VfSTP1* s'accumulent spécifiquement dans les zones mitotiquement actives de l'épiderme de l'embryon au cours de sa formation (Weber et al., 1997). Chez le riz, *OsMST5* est exprimé dans les panicules avant la pollinisation (Takeda et al., 2001). *OsMST4* et *OsMST6* sont fortement exprimés dans le caryopse lors des stades précoces et intermédiaires de son remplissage (Wang et al., 2007, 2008). Ces transporteurs participeraient donc à la formation de la graine et du fruit. Chez l'arabette, *AtSTP1* est exprimé dans les graines en cours de germination et les plantules (principalement dans la racine). L'analyse de mutants démontre qu'*AtSTP1* est responsable de plus de 60 % de l'absorption de glucose chez les plantules (Sherson et al., 2000). Chez les mutants d'insertion pour le transporteur d'hexoses vacuolaire *Atvgt1*, environ 20 % des graines ne germent pas. *AtVGT1* a donc une fonction dans la formation et/ou la germination des graines (Aluri et Büttner, 2007). Dans les plantules de soja, *GsMST1* et *GsMST2* sont exprimés dans différentes zones de la racine (Dimou et al., 2005). Ils jouent donc des rôles différents dans l'approvisionnement en sucre des différentes cellules puits de la racine en croissance.

Certains transporteurs de monosaccharides sont également impliqués dans les interactions hôte-parasite ou hôte-pathogène. Le gène *AtSTP12* est fortement induit dans le syncytium formé lors de l'interaction avec le nematode *Heterodera schachtii*. Son expression est nécessaire au développement de ce dernier. En revanche, l'expression des gènes *AtSFPI*, *AtSTP4* et *AtSTP7* est fortement réprimée dans le syncytium formé lors de l'infection (Hofmann et al., 2009). Chez le maïs, l'expression de *ZmMST1* dans la racine est induite lors de l'infection par la mycorhize *Glomus intraradices*. Cette induction s'accompagne d'une augmentation de la quantité de sucres solubles dans les racines infectées (Wright et al., 2005).

2.5.4.3 Les SWEET transporteurs

Les SWEET caractérisés chez les végétaux sont des transporteurs à faible affinité qui catalysent l'influx ainsi que l'efflux de glucose au travers des membranes, ils ont donc été proposés comme étant des facilitateurs. Le premier SWEET isolé (*AtSWEET1*, *Arabidopsis thaliana*

SWEET 1) a été identifié par criblage de protéines membranaires de fonction inconnue à l'aide d'un nouveau système d'expression en cellules humaines (Chen et al., 2010). *AtSWEET1* a été co-exprimé avec le senseur de glucose à transfert d'énergie par résonance (FRET) dans des cellules humaines présentant une faible activité de transport du glucose. Six et deux des SWEET respectivement isolés chez l'arabette et le riz sont des facilitateurs de glucose. Lorsqu'il est exprimé chez la levure, *AtSWEET1* est capable de compléter les mutant déficients pour le transport du glucose, alors que ce n'est pas le cas pour celui du mannose, du fructose et du galactose. Cependant, son expression en oocyte de xénope a permis de montrer qu'il transporterait le galactose en beaucoup plus faible quantité, mais pas le saccharose. *AtSWEET1* est donc très spécifique du glucose. Son homologue chez le nématode (*CeSWEET1*) serait capable de catalyser l'influx de glucose et de galactose, mais pas de saccharose, lorsqu'il est exprimé chez les oocytes de xénope. La sensibilité des SWEET aux divers protonophores et inhibiteurs connus pour affecter l'activité des transporteurs n'a pas encore été testée. Les SWEET dont la localisation a été étudiée chez les plantes sont présents dans le plasmalemme, alors que leurs homologues sont préférentiellement présents dans l'appareil de Golgi chez l'Homme et le nématode.

Les SWEET sont codés par une famille multigénique dont on connaît dix-sept isoformes chez l'arabette et vingt-deux chez le riz. Les analyses phylogéniques permettent de classer les SWEET en 4 sous-clades (Chen et al., 2010).

Les SWEET jouent un rôle important dans l'approvisionnement en sucres des structures puits (Chen et al., 2010). Ils participent notamment à la nutrition du grain de pollen en formation et des tubes polliniques en croissance. Chez l'arabette, *AtSWEET8* est exprimé dans le tapetum et sa mutation engendre la stérilité mâle. *AtSWEET1* et *AtSWEET8* sont fortement exprimés dans le tube pollinique. *AtSWEET5* est quant à lui présent dans le grain de pollen mature, hydraté et en cours de germination, spécifiquement dans la cellule végétative. Chez le riz, l'inhibition d'*OsSWEET11* par ARN interférence entraîne une réduction des teneurs en amidon dans le pollen et la stérilité mâle (Chen et al., 2010).

Les SWEET sont également impliqués dans la nutrition des pathogènes bactériens et fongiques par la plante hôte (Chen et al., 2010). Chez l'arabette, l'infection par des pathogènes bactériens (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) et fongiques (*Golovinomyces cichoracearum* et *Botrytis cinerea*) induisent fortement l'expression de certains SWEET. Chez le riz, l'induction spécifique de la transcription des transporteurs *OsSWEET11* et *OsSWEET14* par les protéines élicitrices de type TAL (transcription activation-like) : PthXo1 et AvrXa7 (respectivement) est en grande partie responsable de la pathogénicité de *Xanthomonas syringae* pv. *oryza* (Chen et al., 2010).

AtSWEET15 semble impliqué dans le processus de sénescence foliaire. En effet, son expression est fortement induite dans les feuilles sénescentes d'arabette (Chen et al., 2010).

Nous avons vu précédemment que les transporteurs de sucres et notamment ceux transportant le saccharose et les hexoses pourraient être impliqués dans l'importation des sucres nécessaires au débourrement du bourgeon de rosier régulé par la lumière. Nous avons donc cherché à identifier ceux potentiellement impliqués dans ce processus. Lorsque ces travaux de thèse ont débuté, le séquençage des EST de rosier n'avait pas commencé et seul une séquence partielle d'ADNc codant potentiellement pour un transporteur de saccharose et trois pour des transporteurs de monosaccharides étaient disponibles dans les bases de données rosier. Etant donné la diversité des transporteurs de sucres exprimés au sein d'une même espèce, nous avons

Tableau 1. Transporteurs de sucres d'intérêt

Groupe phylogénique	Type de transporteur	Localisation	Principales fonctions
Transporteurs de saccharose (SUC/SUT)			
Groupe 2	Co-transporteur de saccharose/H ⁺ , forte affinité	Plasmalemme	Chargement du phloème Importation dans les tissus puits
Groupe 3	Co-transporteur de saccharose/H ⁺ , faible affinité	Plasmalemme	Importation dans les tissus puits Rechargement du phloème lors du transport à longue distance
Groupe 4	Co-transporteur de saccharose/H ⁺ , faible affinité	Tonoplaste	Possible rôle dans le transport vacuolaire
Transporteurs de type monosaccharide (MST-like)			
STP	Co-transporteur d'hexoses/H ⁺ , forte affinité (excepté STP3)	Plasmalemme	Importation dans les tissus puits (excepté STP3)
TMT	Transporteur de glucose	Tonoplaste	Transport vacuolaire et régulation des pressions osmotiques

choisi d'isoler et d'étudier en priorité ceux jouant un rôle potentiel dans le chargement du saccharose et des hexoses par les cellules puits du bourgeon. Nous avons donc étudié les transporteurs de saccharose et d'hexoses plasmalemmiques connus pour être impliqués dans le chargement des cellules puits. Disposant également des séquences de certains transporteurs de saccharose et d'hexoses tonoplastiques impliqués dans la régulation des pressions de osmotiques, nous avons étudié leur implication dans le processus de photocontrôle du débourrement. Les transporteurs de saccharose et de monosaccharides que nous avons étudié sont présentés dans le Tableau 1.

2.5.4.4 La régulation des transporteurs de sucre

Les niveaux de régulation

Les transporteurs de sucres peuvent être régulés au niveau transcriptionnel (et/ou post-transcriptionnel), traductionnel et post-traductionnel. De nombreux transporteurs de saccharose ou de monosaccharides voient leur taux de transcrit varier en réponse à un stimuli exogène ou endogène à la plante. A titre d'exemple, le taux d'ARNm de certains SUCs est régulé par la température (Lundmark et al., 2006), de manière diurne (par la lumière et/ou le rythme circadien) (Matsukura et al., 2000) et par certaines phytohormones (Dusotoit-Coucaud et al., 2009). De même, le taux d'ARNm de certains MSTs est influencé par la lumière (Stadler et al., 2003), les attaques de pathogènes (Truernit et al., 1996), par les sucres (Atanassova et al., 2003) et certaines phytohormones (Ehness et Roitsch, 1997).

Le taux de transcrit de ces transporteurs peut être régulé au niveau transcriptionnel. Chez l'arabette sauvage, le transporteur de saccharose AtSUC2 est localisé uniquement dans les cellules compagnes du phloème (Stadler et Sauer, 1996). Chez les plants de tabac transgéniques, l'activité du promoteur d'*AtSUC2* est également spécifique aux cellules compagnes du phloème (Wright et al., 2003). Une analyse détaillée de ce promoteur réalisée chez *Arabidopsis thaliana* démontre qu'un fragment de promoteur de 126 pb est suffisant pour induire l'expression typique d'*AtSUC2*. Ce fragment contient deux éléments *cis* de régulation correspondant à des sites potentiels de fixation de facteurs de transcription (Schneidereit et al., 2008). L'expression spécifique d'*AtSUC2* dans les cellules compagnes du phloème est donc régulée au niveau transcriptionnel. De même, des expériences de "nuclear run-on" ont permis de montrer que la transcription de BvSUT1 est inhibée par le saccharose (Vaughn et al., 2002). Cette régulation impliquerait une cascade de phosphorylation de protéines (Ransom-Hodgkins et al., 2003).

L'expression de certains transporteurs de sucres serait également être régulée au niveau traductionnel. Le transporteur de glucose AtSTP9 est exprimé spécifiquement dans le grain de pollen chez l'arabette. Les ARNm d'*AtSTP9* sont présents dans les grains de pollen lors des étapes précoces de leur formation. La protéine AtSTP9 n'est présente qu'en très faible quantité dans les grains de pollens matures alors qu'elle s'accumule fortement dans les tubes polliniques en cours de développement (Schneidereit et al., 2003). Ce différentiel temporel d'expression entre le transcrit et la protéine indique une possible régulation traductionnelle.

L'activité des transporteurs de sucre peut également être régulée au niveau post-traductionnel. Cette régulation peut se faire par le biais d'interactions protéine-protéine. Les transporteurs de saccharose des Solanacées sont capables d'interagir ensembles pour former des oligodimères. *In planta*, LeSUT1, LeSUT2 et LeSUT4 sont co-localisés dans la membrane plasmique des mêmes tubes criblés. *In vitro*, LeSUT1 et LeSUT2 peuvent former des homo-oligodimères ou

des hétéro-oligodimères (entre eux ou avec LeSUT4) (Reinders et al., 2002). Chez la pomme de terre, le transporteur StSUT1 est également capable de former des homo-oligodimères. Cette oligodimérisation n'est pas systémique et se fait préférentiellement dans les faisceaux conducteurs du phloème (Krugel et al., 2008). L'activité des transporteurs de sucres peut être régulée par d'autres types d'interactions protéine-protéine. Chez le pommier, les transporteurs de saccharose (MdSUT1) et de sorbitol (MdSOT6) localisés dans le plasmalemma sont capables d'interagir avec le cytochrome *b5* (MdCYB5) du réticulum endoplasmique en systèmes *in vitro* et *in vivo* (chez la levure et en protoplastes). Chez la levure, ces interactions stimulent l'affinité de MdSUT1 et MdSOT6 pour leur substrat (Fan et al., 2009).

La régulation post-traductionnelle de l'activité des transporteurs fait également intervenir des processus de phosphorylation. Les transporteurs AtSTP1, AtPLT5, AtSTP4, AtSTP7, AtSTP13 et AtSUC1 ont été identifiées comme des protéines phosphorylées localisées dans la membranes plasmiques d'*Arabidopsis thaliana* (Niittyta et al., 2007). AtSUC1, AtVGT2 et AtTMT1 ont également été identifiés comme des phosphopeptides du tonoplaste (Whiteman et al., 2008). L'acide okadaïque (AO, inhibiteur de phosphatase) inhibe l'absorption de saccharose par les feuilles de betterave sans affecter l'activité des pompes à proton, ni la quantité de transporteurs de saccharose. L'AO inhibe donc directement l'activité des co-transporteurs de saccharose/H⁺ de la membrane plasmique en empêchant leur déphosphorylation (Roblin et al., 1998).

Les transporteurs de sucres sont des protéines membranaires et l'environnement lipidique dans lequel ils se trouvent peut avoir un effet sur leur activité. La composition des membranes en différents stérols affecte l'activité de PmSUC2 lorsqu'il est exprimé chez la levure (Delrot et al., 2000).

Enfin, l'activité des transporteurs de sucres est régulée indirectement par le biais du gradient de protons. L'activité des co- ou anti-transporteurs de saccharose/H⁺ est dépendante de la force motrice. Des modulations de l'activité des H⁺/ATPases affecterait donc immédiatement les propriétés cinétiques des transporteurs de sucres (Williams et al., 2000).

Les facteurs de régulation

L'expression et/ou l'activité des transporteurs de sucres peuvent être régulées par différents facteurs abiotiques ou biotiques, exogènes ou endogènes à la plante. Parmi les facteurs exogènes à la plante, on retrouve des facteurs biotiques. L'expression du gène *AtSUC1* est rapidement induite lors de l'infection de l'arabette par l'orobanche (plante parasite) (Vieira Dos Santos et al., 2003). *AtSTP4* est quant à lui induit en réponse à des attaques pathogènes (*Alternaria brassicicola* et *Fusarium oxysporum*) et à des éliciteurs (extraits de *Pseudomonas syringae* et chitine) (Truernit et al., 1996).

Les transporteurs de sucres sont également régulés par des facteurs exogènes abiotiques tels que la lumière. Le transporteur DcSUT1 de la carotte est régulé par la lumière dans les feuilles, où ses ARNm s'accumulent plus fortement le jour que la nuit (Shakya et Sturm, 1998). L'expression d'*OsSUT1* est induite par la lumière dans l'embryon de riz en cours de germination (Matsukura et al., 2000). Paradoxalement, son taux de transcrite est élevé dans les plantules étiolées et diminue lors du verdissement induit par la lumière (Hirose et al., 1997). Chez les Solanacées, l'accumulation des ARNm et de la protéine de SUT1 est plus importante à la lumière qu'à l'obscurité (Kühn et al., 1997). Les plantes StSUT4-RNAi présentent entre autre une rédu-

tion de sensibilité aux longueurs d'ondes de lumière enrichies en rouge sombre (*i.e.* conditions d'ombrage) (Chincinska et al., 2008). Kühn et Grof (2010) ont proposé un modèle dans lequel StSUT4 serait régulé par le phytochrome B. *AtSTP1* est fortement et rapidement induit dans les feuilles exposées à l'obscurité. Ce transporteur est également régulé de manière diurne (Stadler et al., 2003). La température affecte également l'expression de certains transporteurs de saccharose. Chez les arabettes sauvages, le taux de transcrite d'*AtSUC1* et *AtSUC2* est induit dans les feuilles sources exposées aux températures froides (5 °C) (Lundmark et al., 2006). La quantité de transcrits de *JrSUT1*, un transporteur potentiel de saccharose chez le noyer, est induite par les cycles de congélation/décongélation répétés (Decourteix et al., 2006). Les stress salins et hydriques agissent également sur le taux de transcrits des transporteurs *AtTMT1* et *AtTMT2* (Wormit et al., 2006). Enfin, on note une accumulation des ARNm d'*AtSTP3*, *AtSTP4* et *AtSUC3* en réponse à la blessure (Truernit et al., 1996; Büttner et al., 2000; Meyer et al., 2004).

Les transporteurs de sucres sont également régulés par des facteurs endogènes à la plante tels que par leur propre substrat ou d'autres sucres. Dans les suspensions cellulaires de vigne, le taux de transcrits du transporteur d'hexoses *VvHT1* est fortement inhibé par le glucose et le 2-deoxyglucose (analogue du glucose phosphorylé par l'hexokinase mais non métabolisé) (Conde et al., 2006), alors qu'il est induit par le saccharose et le palatinose (isomère du saccharose non transporté), mais pas par le fructose (Atanassova et al., 2003). Les sucres affectent également l'expression d'*AtTMT1* (glucose) et *AtTMT2* (glucose et fructose) (Wormit et al., 2006). Les phytohormones telles que l'auxine (Harms et al., 1994), les cytokinines (Harms et al., 1994; Ehness et Roitsch, 1997), les gibbérellines (Chincinska et al., 2008), l'acide abscissique (Cakir et al., 2003; Oliver et al., 2007; Hayes et al., 2010) et l'éthylène (Chincinska et al., 2008; Dusotoit-Coucaud et al., 2009; Tang et al., 2010) modulent également l'expression de divers transporteurs de sucres.

Dans le cadre des axes de recherches développés par l'UMR SAGAH et d'après les données bibliographiques exposées précédemment, nos réflexions nous ont conduit à explorer les points suivants.

Chez diverses espèces le débourrement semble nécessiter une mobilisation des réserves carbonées du bourgeon et/ou de la portion de tige adjacente. Cependant, les sucres utilisés par le bourgeon ne sont pas toujours des mêmes en fonction de l'espèce considérée. De plus, aucune étude n'a permis de démontrer clairement que le bourgeon est un puits qui nécessite d'importer les sucres pour débourrer. Dans un premier temps, nous avons donc cherché à déterminer **les besoins en sucres du bourgeon de rosier pour débourrer lorsque les conditions environnementales sont favorables et que les inhibitions corrélatives (paradormances) ont été supprimées.**

Les bourgeons de pêcher et de noyer sont capables d'importer activement de plus grandes quantités de sucres lorsqu'ils sont prêt à débourrer que lorsqu'ils sont dormants. La levée de dormance semblent donc influencer l'aptitude des bourgeons à importer les sucres en provenance de la tige nécessaires à leur débourrement. Chez le rosier, le débourrement des bourgeons axillaires est principalement inhibé par les phénomènes de paradormance (dominance apicale, portion de tige et feuille axillante). Lorsque ces inhibitions corrélatives sont supprimées, le débourrement est totalement inhibé en l'absence de lumière. Nous avons donc essayé de déterminer si la **capacité des bourgeons de rosier à importer des sucres est sous le double contrôle des inhibitions corrélatives et de la lumière.**

Le déchargement du phloème et le transport des sucres qui s'ensuit dans le bourgeon ne sont pas encore complètement élucidés et semblent pouvoir varier selon l'espèce et le stade de développement considéré. Cette constatation nous a amenés à déterminer, chez le rosier, les **voies de déchargement et de transport des sucres impliquées dans l'approvisionnement en sucre du bourgeon lors du débourrement, contrôlé par la lumière.**

Jusqu'à présent de nombreux transporteurs de sucres (saccharose, polyols et monosaccharides) ont été mis en cause dans l'importation et le transport subcellulaire des sucres dans les organes puits. Cependant, la fonction et la régulation de ces transporteurs n'a pas été étudiée dans le bourgeon végétatif. Nous avons donc entrepris d'**identifier les différentes isoformes de transporteurs exprimées dans cette structure et leur rôle potentiel dans l'approvisionnement en sucre du bourgeon pour son débourrement.** Nous avons également étudié **leur régulation en réponse à la lumière et à l'auxine (hormone à l'origine du phénomène de dominance apicale).**

L'approvisionnement en sucres du bourgeon semblent jouer un rôle très important dans le photocontrôle du débourrement. Nous avons donc testé **l'effet d'un apport exogène de sucres sur le débourrement du bourgeon rosier à l'obscurité, condition inhibitrice de ce processus *in planta*.**

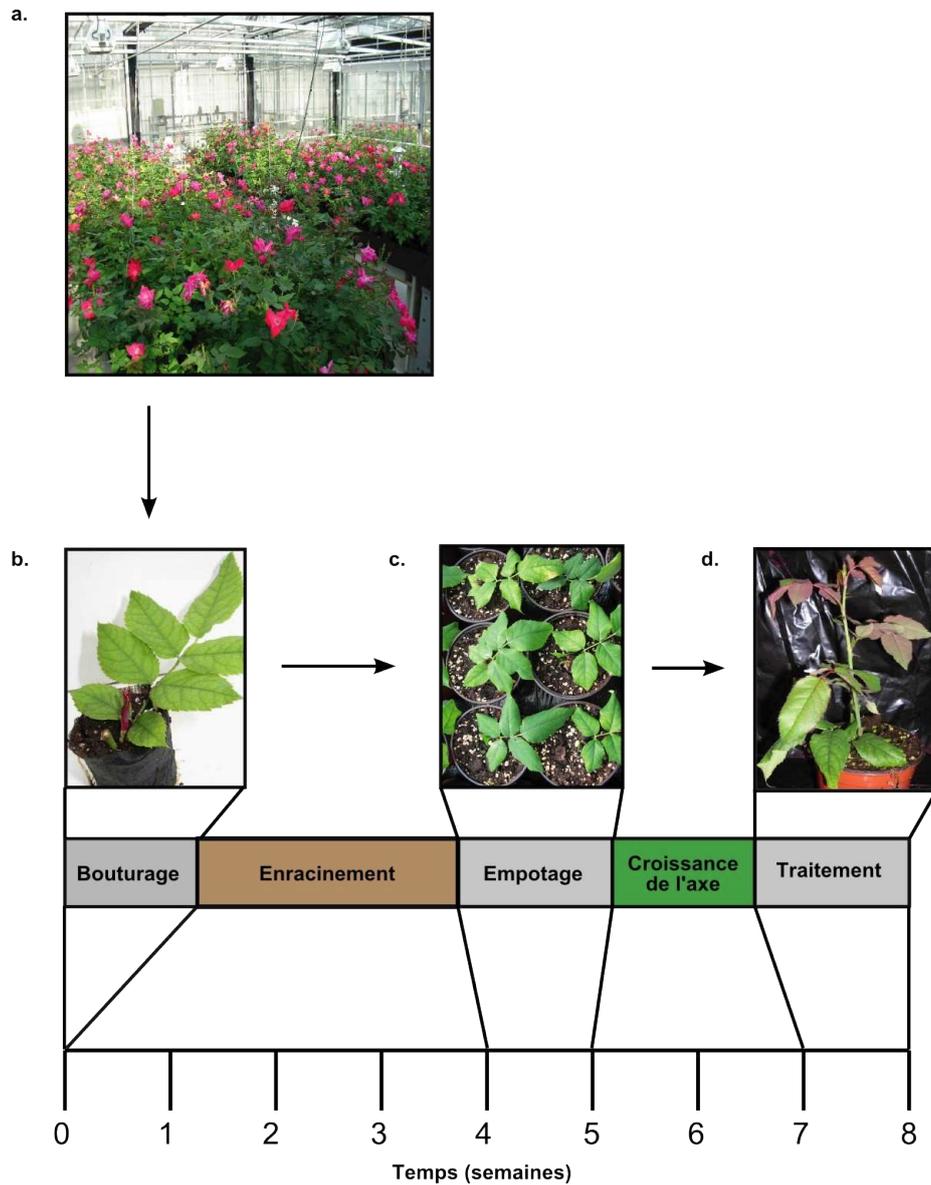


FIGURE 7 – La plante modèle est un rosier hybride : *Rosa hybrida* cv 'Radrazz'. Les plantes utilisées pour les expérimentations sont produites par bouturage. Les boutures sont prélevées sur des pieds mères (a). Elles sont plantées dans des minimottes de terreau (b) et placées sous une atmosphère humide pour provoquer l'enracinement. Elles sont ensuite empotées (c) et placées en serre pour favoriser la croissance de l'axe principal. Une fois au stade bouton floral visible (d), les plantes sont utilisées pour les expérimentations.

Chapitre 3

Matériel et Méthodes

3.1 Modèles d'étude

3.1.1 Plante modèle et conditions de culture

La plante modèle est un rosier de jardin hybride au port buissonnant, *Rosa hybrida* cv "Radrazz" (Knock Out®) (Figure 7 a). Il est remontant, ce qui signifie qu'il fleurit plusieurs fois par an en conditions naturelles. Ses axes sont constitués de 3 à 11 métamères, leur nombre étant fonction de la position de l'axe dans la plante. Comme tous les rosiers il présente de l'hétéroblastie caractérisée par une succession de feuilles de type composées imparipennées dont le nombre de folioles varie de 0 à 7. En partant de la base de l'axe, on verra ainsi se succéder des feuilles stipulaires (réduites à la stipule), des feuilles comprenant un nombre de folioles croissant (3, 5 et 7) puis décroissant (5, 3 et 1).

Des boutures de noeuds portant une feuille à cinq ou sept folioles (Figure 7 b) sont réalisées à partir de pieds mères cultivés en serre (Figure 7 a). Elles sont enfoncées dans des mottes FERTISS (FERTIL) et placées sous système d'aspersion (80-90 % d'humidité dans l'air) pendant 4 à 5 semaines pour provoquer l'enracinement. Les boutures enracinées sont empotées en pots de 500 mL contenant un mélange tourbe, fibres de coco et perlite (70 % /20 % /10 %) et placées en serre à 25°C ± 5°C (Figure 7 c). Environ 3 semaines après l'empotage on obtient des rosiers présentant uniquement un axe d'ordre I dont le bouton floral est visible (stade 'Bouton Floral Visible' ou BFV) (Figure 7 d). A ce stade les bourgeons axillaires sont encore dormants, en raison de la dominance apicale exercée par le bourgeon terminal.

Les expériences sont ensuite réalisées sur des plantes au stade BFV comportant au minimum sept feuilles multi-foliolées, dont au moins l'une d'entre elles possède sept folioles. Le bourgeon étudié est toujours celui axilé par la 3^{ème} feuille multi-foliolée proximale en partant de la base de l'axe. Il est appelé bourgeon d'intérêt dans la suite du texte.

3.1.2 Modèles expérimentaux

3.1.2.1 Plantes entières

Nous avons utilisé des plantes dont le développement est compris entre les stades BFV et Couleur Pétale Visible (CPV, stade à partir duquel le bouton floral est bien développé et commence à s'ouvrir) pour les analyses du taux de transcrits dans les différents organes (bourgeons dormants et débourrés, bouton floral, feuilles jeunes et matures, tige et racine).

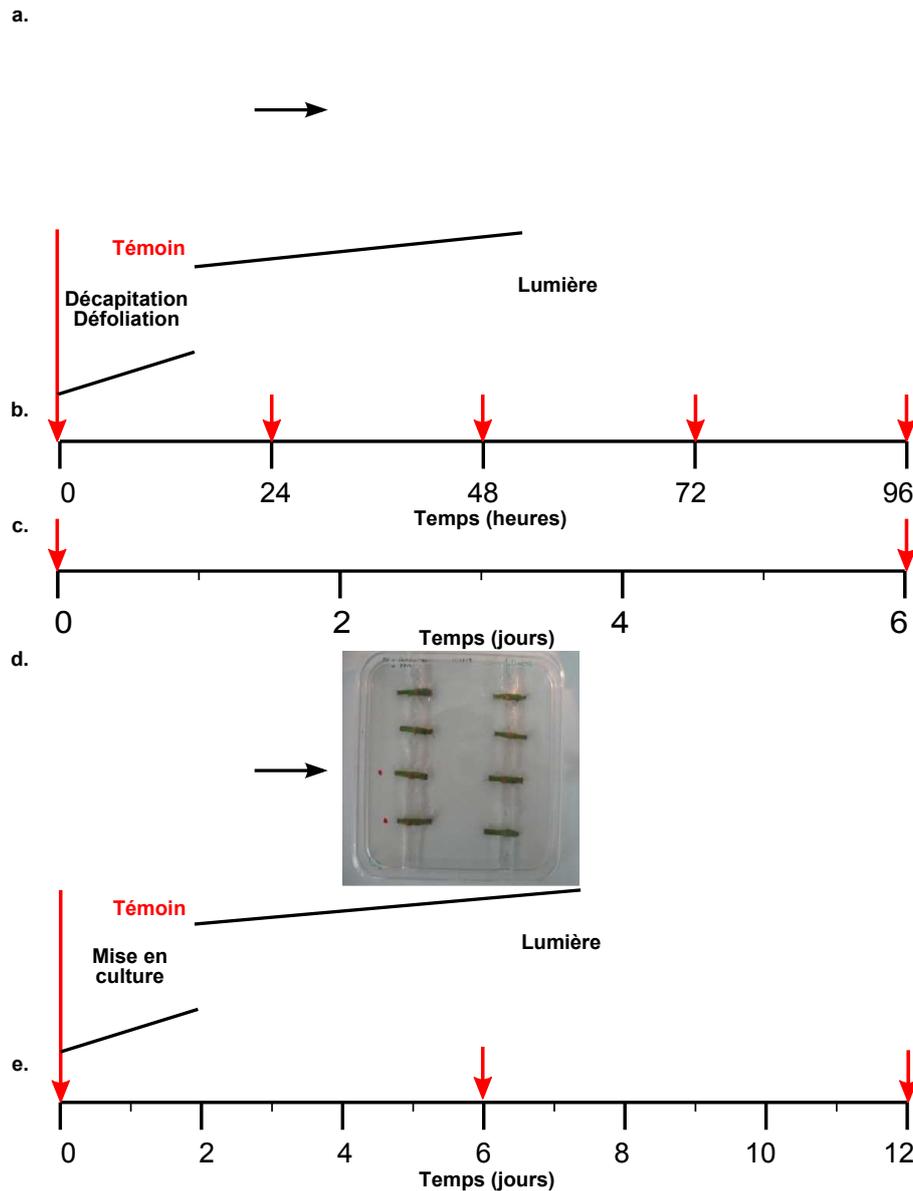


FIGURE 8 – Modèles expérimentaux. Dans le premier modèle, les plantes sont décapitées puis placées à la lumière ou à l'obscurité (a). Pour les analyses transcriptionnelles et biochimiques les prélèvements sont effectués entre 24 et 96 h après la décapitation (b). Les analyses morphologiques sont réalisées à 6 j après la décapitation (c). Dans le second modèle, des noeuds sont isolés et cultivés *in vitro* (d). Les analyses morphologiques sont réalisées à 6 et 12 j après la mise en culture (e). Les flèches rouges indiquent les prélèvements ou les observations réalisées. Des plantes non traitées sont utilisées comme témoins.

3.1.2.2 Plantes décapitées

Pour les études à l'échelle de l'individu, nous avons utilisé le modèle de plante décapitée décrit par Girault et al. (2008) (Figure 8 a et b). Dans ce modèle, les plantes sont décapitées 1 cm au dessus du bourgeon d'intérêt (décrit page 31) afin de supprimer la dominance apicale exercée par les bourgeons distaux. Elles sont défoliées pour supprimer l'interaction entre la surface foliaire et la capacité de débourrement (Le Hir et al., 2006). Ensuite, les plantes sont placées sous lumière blanche ($70 \pm 10 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, tubes fluorescents L36W/77 Fluora OSRAM, Allemagne) ou à l'obscurité (sous sac plastique opaque), selon une photopériode J :N (16 :8) et à $23^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ pendant un temps variable. Le traitement est de 24, 48, 72 ou 96 h pour les études transcriptomiques et biochimiques (Figure 8 a), et de 6 j pour les études morphologiques (Figure 8 b). Des plantes entières au stade BFV non décapitées sont utilisées comme témoins avant traitement.

3.1.2.3 Noeuds isolés en culture *in vitro*

Des noeuds isolés ont été cultivés *in vitro* de manière à pouvoir contrôler l'apport de sucres exogènes aux bourgeons (Figure 8 c).

Une portion de tige portant le bourgeon d'intérêt (décrit page 31) ainsi que ses voisins est prélevée. Les feuilles et les aiguillons sont retirées délicatement. La tige est immergée dans de l'eau pour limiter la cavitation dans les faisceaux le temps des prélèvements. Elle est ensuite désinfectée dans l'éthanol 70 %, recoupée à 1 cm de part et d'autre du bourgeon, puis le noeud de 2 cm est placé en culture. Les noeuds sont cultivés dans des boîtes de Pétri carrées (120 mm x 15 mm) contenant un milieu de Murashige & Skoog (MS) modifié (Annexe A), additionné de 0, 100, 250 ou 500 mM de mannitol, sorbitol, glucose, fructose ou saccharose. Le mannitol est utilisé comme témoin osmotique, étant donné qu'il n'est pas métabolisé chez diverses espèces végétales. Les boîtes sont scellées par du film alimentaire puis placées dans une enceinte climatique à 23°C (BINDER, Allemagne). Les bourgeons sont alors cultivés en présence de lumière blanche ($125 \pm 25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, néons OSRAM L18W/77 Fluora) selon une photopériode J :N (16 :8), ou à l'obscurité (boîtes carton doublées de papier aluminium et scellées au ruban adhésif). La durée du traitement est de 72 h pour les études transcriptionnelles et biochimiques, et de 6 et 12 j pour les études morphologiques.

Le même système expérimental a été utilisée pour contrôler l'apport exogène d'auxine aux bourgeons. Dans ce cas, les noeuds ont été cultivés 72 h dans un milieu de Murashige & Skoog (MS) modifié (Annexe A), additionné de 0,1 , 1 et 10 μM d'acide 1-naphtalène-acétique (NAA, analogue synthétique de l'auxine), à 23°C en présence de lumière blanche ($125 \pm 25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, néons OSRAM L18W/77 Fluora) selon une photopériode J :N (16 :8).

3.2 Méthodes expérimentales

3.2.1 Analyses morphologiques

Nous avons déterminé l'état de débourrement, la longueur, ainsi que le nombre de pièces foliaires des bourgeons pour estimer leur degré de développement. Nous avons également pris des photos des bourgeons présentant une morphologie représentative pour chaque traitement.

FIGURE 9 – État de débourrement des bourgeons. Chez le bourgeon dormant (a) on voit les écailles (e) bien plaquées contre la tige. Lorsque le bourgeon est débouillant (b) on voit les écailles s'écarter et les feuilles stipulaires (fs) apparaître. Lorsque le bourgeon a débouillé (c) on voit les feuilles multifoliolées (fm) hors du bourgeon.

Un bourgeon est considéré comme étant complètement dormant lorsque ses écailles sont bien plaquées contre la tige et jointives entre elles (Figure 9 a). Puis, lorsque le bourgeon commence à se développer, ses écailles commencent à s'écarter et laisser paraître les premières feuilles stipulaires (sans folioles). Le bourgeon est alors considéré comme débouillant ou gonflé (Figure 9 b). Il est finalement considéré comme débouillé lorsque les premières feuilles caractéristiques, potentiellement photosynthétiquement actives, sont apparentes (Figure 9).

La longueur des bourgeons est déterminée de la base du bourgeon jusqu'à sa pointe à l'aide d'un pied à coulisse (Digital caliper, 0-150 mm) et de la loupe binoculaire.

Enfin, le nombre de pièces foliaires est déterminé par dissection manuelle sous loupe binoculaire, à l'aide de pinces fines et d'une aiguille. Les écailles protégeant le bourgeons sont comprises dans le nombre de pièces foliaires. Les mesures sont réalisées sur un minimum de 14 plantes.

3.2.2 Analyses histologiques

3.2.2.1 Marquage des faisceaux conducteurs et des connexions symplasmiques

Les mouvements de la sève phloémienne peuvent être tracés à l'aide de 2 sondes fluorescentes : l'HPTS (8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic) et la CF (carboxyfluorescein) (Wright et Oparka, 1996). Ces deux composés sont fournis aux cellules sous forme d'acétates : l'acétate de HPTS (8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic, trisodium salt, également nommé pyranine) et le 5(6)-CFDA (5-(et 6)-carboxyfluorescein diacetate). Sous forme d'acétate, ces composés peuvent traverser les membranes. Lorsqu'ils entrent en contact avec des cellules vivantes, les groupements acétate sont clivés par des estérases endogènes et les sondes fluorescentes (HPTS et CF) alors libérées ne peuvent plus traverser les membranes. Elles se retrouvent séquestrées dans les cellules où elles ont été libérées et ne peuvent circuler vers d'autres cellules que par voie symplasmique. Lorsque ces sondes entrent dans les faisceaux conducteurs du phloème, elles sont rapidement entraînées dans la circulation générale et nous permettent ainsi d'observer le réseau phloémien et les connexions symplasmiques de celui-ci. D'après Wright et Oparka (1996), l'HPTS présenterait plusieurs avantages en tant que marqueur symplasmique par rapport à la CF, notamment en terme de localisation cellulaire. En effet, le HPTS serait localisé dans le cytoplasme, le noyau et les vacuoles alors que la CF serait rapidement séquestrée dans les vacuoles. Cependant, la CF présente un avantage important par rapport au HPTS : contrairement à lui, elle n'est pas fluorescente sous forme d'acétate. Cette caractéristique assure un marquage spécifique du phloème, préférable à un comarquage xylème/phloème. Nous avons donc choisi d'utiliser le 5(6)-CFDA pour réaliser nos essais.

Le marquage des faisceaux conducteurs du phloème arrivant au bourgeon est réalisé sur des plantes non traitées (bourgeons dormants) ou décapitées puis placée 72 à 120 h à la lumière (bourgeons en cours de débouillage) selon les modalités de culture décrites page 32 (Figure 10). Les plantes décapitées sont défoliées de façon à laisser uniquement le pétiole et le rachis de la feuille axillant le bourgeon d'intérêt pour réaliser le marquage (Figure 10 a).

Le 5(6)-CFDA est un composé peu stable et très photosensible, il est donc conservé sous forme de solution mère à 100 mg.mL⁻¹ dans du DMSO, à -20°C et manipulé à l'abri de la lumière. Le jour du marquage, le rachis ainsi que l'extrémité de la tige décapitée sont recoupés à l'aide d'un scalpel. La plante est ensuite marquée par incubation du pétiole dans 50 µL de 5(6)-CFDA à 500 µg.mL⁻¹ (Invitrogen, France) ou dans de l'eau (témoins négatifs) pendant 4 h à l'obscurité.

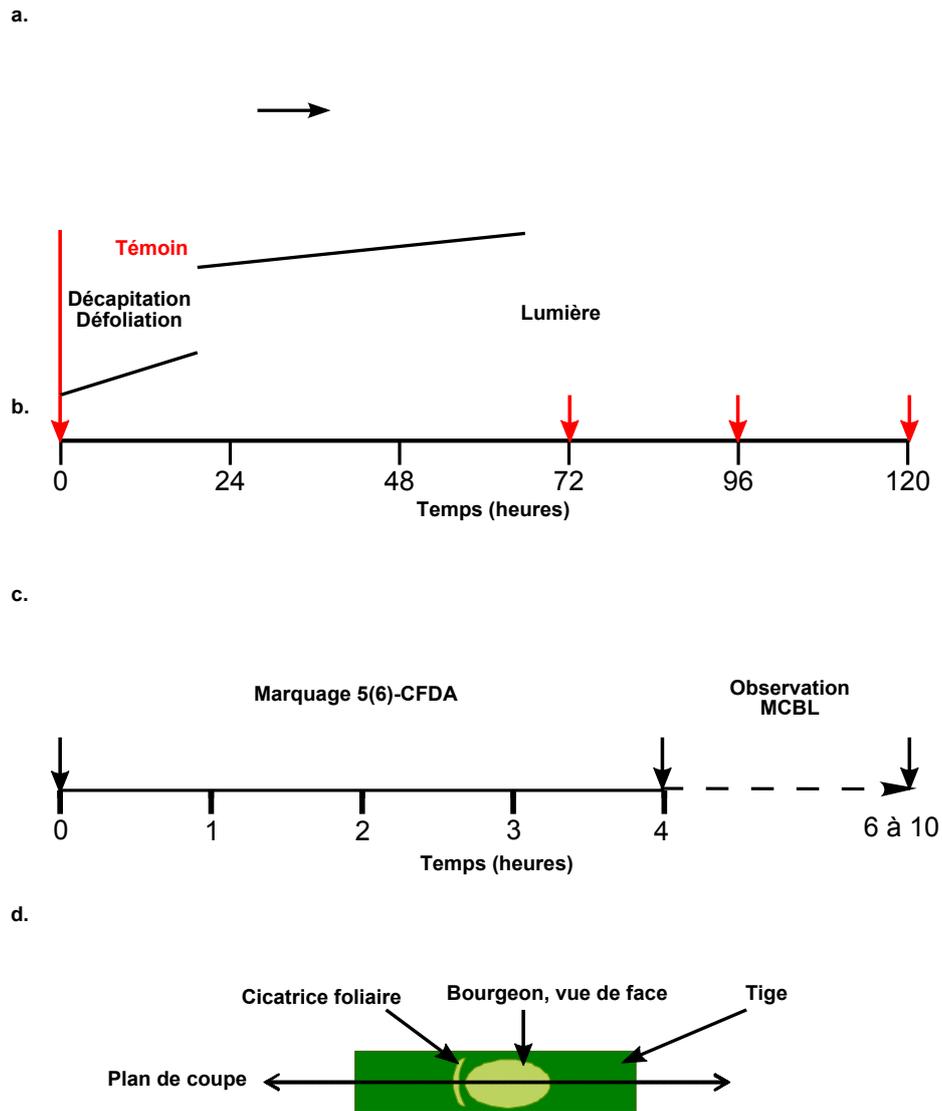


FIGURE 10 – Marquage des faisceaux conducteurs au 5(6)-CFDA. Les plantes sont décapitées et défoliées partiellement de sorte qu’il ne reste que le pétiole et le rachis de la feuille axillant le bourgeon d’intérêt pour réaliser le marquage (a). Les plantes sont immédiatement marquées (témoins bourgeons dormants) ou placées à la lumière pendant 72 à 120 h avant le marquage (b). Les flèches rouges indiquent les temps auxquels les marquages sont réalisés. Pour effectuer le marquage, le rachis est recoupé puis incubé 4 h en présence de 5(6)-CFDA (c). Les bourgeons marqués sont ensuite observés au microscope confocal à balayage laser (MCBL) (c). Pour l’observation, la portion de tige portant le bourgeon marqué est coupée dans le sens de la longueur en passant par le milieu du bourgeon (d).

A la fin de l'incubation, la portion de tige portant le bourgeon d'intérêt est coupée à 1 cm de part et d'autre de celui-ci. Elle est ensuite conservée dans un microtube de 0,5 mL contenant 50 μ L d'eau distillée, à l'obscurité, en attendant son observation dans la demi-journée.

Les tissus fraîchement marqués sont préparés puis observés à l'aide d'un système de microscopie confocale à balayage laser (MCBL A1, Nikon). La portion de tige est coupée longitudinalement en passant par le milieu du bourgeon. La coupe est réalisée manuellement à l'aide d'une lame de rasoir. L'explant est ensuite posé sur une lamelle (25 x 60 mm) avec une goutte de milieu de montage contenant 80 % de glycérol dilué dans une solution osmotique contrôlée (100 mM mannitol, 20 mM MES, 0,25 mM CaCl_2 , 0,25 mM MgCl_2 , pH5,5). Ce milieu de montage permet de limiter le dessèchement des tissus et la diffusion de la sonde fluorescente. La CF est ensuite excitée à 488 nm et l'émission récoltée entre 500 et 530 nm. L'autofluorescence des tissus est excitée à 636 nm et l'émission récoltée entre 662 et 737 nm.

3.2.3 Analyses biochimiques

3.2.3.1 Dosages de sucres

Le dosage est réalisé sur des tissus collectés dans l'azote liquide et conservés à -80°C . Les tissus (40 mg, soit 8 à 40 plantes selon le traitement) sont broyés finement à l'aide de sable de fontainebleau et d'un mini pilon, dans un microtube de 1,5 mL refroidi dans l'azote liquide. Le broyage se poursuit ensuite en présence de 200 μ L de tampon de broyage (Annexe B), jusqu'à obtention d'un broyat liquide et homogène. Le mortier est rincées avec 200 μ L de tampon de broyage. Les 400 μ L de broyat sont ensuite centrifugés à 12000 g pendant 3 min à 4°C . Le surnageant est prélevé, homogénéisé et conservé à -20°C . Le dosage de l'amidon, du glucose, du fructose et du saccharose sont ensuite réalisés par une méthode enzymatique à l'aide des kits ENZYTEC™ *fluid* D-Glucose, Sucrose (Total Glucose) et D-Fructose (SCIL Diagnostics, Allemagne). La lecture des dosages est effectuée par un automate séquentiel Konelab 20i (Thermo Electron, Finlande). Chaque dosage est réalisé sur 3 lots biologiques distincts.

3.2.3.2 Absorption de sucres radio-marqués par les bourgeons

Les mesures d'absorption de sucres sont réalisées sur les bourgeons provenant de plantes non traitées ou décapitées puis placées 72 et 96 h à la lumière ou à l'obscurité (Figure 8 a). Chaque mesure d'absorption est effectuée sur 3 lots biologiques distincts, chacun constitué d'un mélange de 3 à 5 bourgeons. Lors de la mesure d'absorption, les bourgeons sont maintenus dans des conditions lumineuses identiques à celles avant leur prélèvement (lumière ou obscurité). Les bourgeons sont récoltés, pesés et placés immédiatement dans 300 μ L de solution de pré-incubation (mannitol 100 mM, MES 20 mM, CaCl_2 0,25 mM, MgCl_2 0,25 mM, pH 5,5) pendant 30 min à la lumière ou à l'obscurité. Les bourgeons sont séchés brièvement et placés sur un milieu d'incubation semi-gélosé (milieu de pré-incubation additionné d'agar à 8 g/L) contenant 1 mM de $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ saccharose (21,8 GBq.mmol⁻¹, PerkinElmer, France), $[\text{2}-^3\text{H}]$ D-glucose (74 GBq.mmol⁻¹, PerkinElmer) ou $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ D-fructose (10,9 GBq.mmol⁻¹, Amersham, France) à 0,5 $\mu\text{Ci.mL}^{-1}$ pour une incubation de 2 h à la lumière ou à l'obscurité. Les bourgeons sont placés sur le milieu d'incubation de sorte que seule la partie du bourgeon initialement rattachée à la tige soit en contact avec celui-ci. Après l'incubation, les bourgeons sont lavés par 3 bains successifs de 5 min dans 500 μ L de solution d'incubation pour enlever la radioactivité non absorbée. Les tissus sont ensuite placés dans des tubes à scintillation de 5 mL et traités 12 h à 55°C dans 300 μ L de solution de digestion (acide perchloridrique 13 %, peroxyde d'hydrogène 12 %, triton X100 0,04 %). Ce traitement permet de digérer les tissus et de libérer la radioactivité absorbée par ceux-ci. 4 mL de liquide à scintillation (Ecolite(+)TM, MP Biomedicals, France) sont ajoutés

à chaque échantillon et la radioactivité mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation TRI-CARB 1900 TR Liquid scintillation analyzer(ΔPACKARD, A canberra company).

Afin de déterminer si l'absorption de sucres observée fait intervenir un phénomène actif de chargement des sucres, des bourgeons ont également été traités de la même façon avec un milieu d'incubation additionné de 0,5 μM de CCCP (Carbonyl Cyanide *m*-Chloro-Phenylhydrazone, Sigma, France) durant la pré-incubation des bourgeons et l'incubation en présence de sucres radiomarqués. Le CCCP est un protonophore ou agent découplant (Sauer et Stolz, 1994), qui supprime le gradient de protons et donc inhiber l'activité des co-transporteurs sucre/H⁺.

3.2.4 Analyses à l'échelle moléculaire

3.2.4.1 Extraction d'ARN et synthèse d'ADNc

Les tissus collectés sont immédiatement congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C. Ils (50 à 100 mg, soit 15 à 80 plantes) sont ensuite broyés finement dans l'azote liquide en présence de PVP40 (10 % poids/poids) à l'aide d'un mortier et d'un pilon. Les extractions d'ARNs sont immédiatement réalisées à partir du broyat obtenu.

Extraction d'ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits à l'aide du kit NucleoSpin® RNA Plant (Macherey Nagel, France) selon les recommandations du fournisseur. Pour la première étape d'extraction, nous avons utilisé le tampon RAP additionné de 1 % de bêta-mercaptoéthanol (vol/vol). A la fin du protocole, les ARNs totaux (traités à la DNase) sont suspendus dans de l'eau sans RNase et conservés à -80°C. La quantité d'ARNs est estimée par dosage à l'aide du spectrophotomètre UV Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, EUA). Leur qualité est vérifiée par migration en gel d'agarose 1,5 % dans du tampon TAE 0,5 X. Une fois la migration terminée, le gel est incubé 15 min dans un bain de TAE 0,5X additionné de bromure d'éthidium (BET)(0,1 μL/mL) et les bandes correspondant aux ARN ribosomiques sont visualisées sous lumière UV.

Synthèse d'ADNc

La transcription inverse (RT) des ARNs messagers est réalisée à partir d'1 μg d'ARNs totaux, à l'aide du kit SuperScript®III Reverse Transcriptase (Annexe C). Les ARNs, amorces oligoDT(20) et les dNTPs sont dénaturés. Puis la RT des ARNm est réalisée dans un volume final de 20 μL.

La qualité de la RT, ainsi que l'absence de contamination de celle-ci par de l'ADN génomique est vérifiée par PCR avec des amorces situées de part et d'autre d'un intron du gène *RhGAPDH* (Annexes D et E). Les produits de PCR sont ensuite séparés par migration en gel d'agarose 1 % et visualisés sous lumière UV à l'aide de BET comme décrit page 35. Le marqueur de masse moléculaire SmartLadder™ (Eurogentec, France) est alors utilisé pour estimer la taille des produits de PCR.

Les ADNc sont ensuite purifiés à l'aide du kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN, France) selon recommandations du fabricant, suspendus dans 80 μl de tampon d'éluion, aliquotés par 20 μL et conservés à -80°C. Cette étape entraîne une dilution au 1/4 des ADNc. Au besoin, ces aliquots sont ensuite dilués au 1/100^{ème}, aliquotés par 50 μL et conservés à -20°C

afin d'éviter les congélations/décongelations. Les ADNc utilisés pour réaliser les PCR sont donc dilués au 1/400^{ème}.

3.2.4.2 Clonage des séquences codant pour des transporteurs de sucres

Clonage des séquence ADNc partielles de transporteurs de sucres

Les ADNc partiels des différents transporteurs de sucres sont isolés à partir d'ADNc provenant de différents organes de *Rosa hybrida* cv "Radrazz" (Knock Out®) par une technique de PCR sur PCR avec des amorces dégénérées suivi d'un clonage dans le vecteur pGEM®-T Easy (Promega, France). Cette technique consiste à amplifier des ADNc dont la séquence est inconnue chez une espèce donnée en utilisant des amorces dégénérées choisies par homologie de séquence de ce gène chez des espèces proches de celle considérée. Nous nous sommes ainsi basé sur l'alignement de séquences de transporteurs de sucres connus chez diverses espèces végétales pour définir les couples d'amorces dégénérées que nous avons utilisé pour isoler ces mêmes transporteurs chez le rosier.

Une première PCR est réalisée à partir de 5 µL d'ADNc provenant de différents organes (bourgeons dormants et débourrants, bouton floral, feuilles jeunes et matures, tige et racine) avec des amorces dégénérées (Annexe F) dans un volume final de 30 µL selon le protocole décrit en Annexe G. Puis, une seconde PCR est réalisée à partir de 5 µL de produit de la première PCR selon les mêmes modalités que celle-ci. Cette double amplification est nécessaire pour obtenir des produits en quantité suffisante pour le clonage.

Les produits de PCR sur PCR sont visualisés par migration en gel d'agarose 1 % et révélation à l'aide de BET sous lumière UV comme décrit page 35. Si le produit de PCR sur PCR ne contient qu'un seul amplicon, il est directement purifié à l'aide du kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN) et repris dans un volume final de 50 µL de tampon d'élution. Si le produit de PCR sur PCR contient plusieurs amplicons de taille différentes, les bandes correspondantes aux différents amplicons sont découpées après leur séparation en gel d'agarose 1 %, extraites à l'aide du kit NucleoTrap® et reprises dans un volume final de 30 à 50 µL de tampon d'élution.

Le clonage des séquences amplifiées est réalisé par ligation de 1,5 µL de produit de PCR purifié avec 0,5 µL vecteur pGEM®-T Easy (25 ng), 0,5 µL de T4 DNA ligase (1,5 unités) et 2,5 µL de tampon de ligation 2X, dans un volume final de 5 µL, pendant 2 h à température ambiante puis une nuit à 4°C. Les produits de ligation sont ensuite utilisés pour transformer les *Escherichia coli* JM109 selon le protocole indiqué en Annexe H. Une fois transformés les *E. coli* sont criblés par PCR sur colonie selon le protocole indiqué en Annexe I. Les produits de PCR sont visualisés par migration en gel d'agarose 1 %. Les colonies positives au criblage sont ensuite cultivées une nuit à 37°C sur milieu LB semi-gélosé additionné de 50 µg.mL⁻¹ d'ampicilline et envoyés à la compagnie Millegen (France) pour que les fragments isolés soient séquencés.

Clonage de la séquence ADNc complète de RhSUC2

La séquence ADNc complète du gène *RhSUC2* a été isolé par technique de RACE (Rapid Amplification of cDNA ends) à partir d'ARNm extraits de bourgeons débourrants.

L'extraction des ARNs totaux a été réalisée selon le protocole décrit page 35, à partir de bourgeons issus de plantes décapitées, défoliées puis placées 72h à la lumière (200 mg de tissus,

soit 50 plantes). Environ 1 µg d'ARN messagers ont été extraits à partir de 75 µg d'ARN totaux à l'aide du kit Dynabeads® mRNA Purification (Dyna, Norway) selon les recommandations du fournisseur. Une banque d'ADNc pleine longueur arborant des adaptateurs de séquence connus à leurs extrémités est créée à partir de ces ARNm à l'aide du kit Marathon® cDNA Amplification selon recommandations du fournisseur (Clontech, France). Les extrémités 5' et 3' de l'ADNc *RhSUC2* sont ensuite amplifiées par PCR avec des amorces spécifiques de *RhSUC2* et des adaptateurs. Les PCRs sont réalisées à partir de 5 µL de banque ADNc pleine longueur avec adaptateurs dilués au 1/250^{ème} dans du tampon tricine EDTA (fourni avec le kit Marathon) à l'aide de l'Advantage® 2 PCR Enzyme System (BD Biosciences, Clontech) dans un volume final de 50 µL et selon les conditions décrites en Annexe J. Les produits de PCR obtenus sont visualisés par migration en gel d'agarose 1 % et révélation à l'aide de BET sous lumière UV comme décrit page 35. Les fragments de tailles attendues sont excisés du gel, purifiés à l'aide du kit NucleoTrap® et repris dans un volume final de 25 µL de tampon d'éluion. Ils sont ensuite clonés dans le vecteur pGEM®-T Easy (Promega) et séquencés comme décrit page 36.

3.2.4.3 Analyses transcriptomiques

RT-PCR semi-quantitatives

La RT-PCR semi-quantitative permet d'évaluer de façon approximative le taux de transcrit d'un gène exprimé dans une condition donnée. Les ARNs totaux sont extraits et soumis à une transcription inverse comme décrit page 35. Les ADNc obtenus sont ensuite amplifiés par PCR à l'aide d'amorces spécifiques de chaque gène étudié (Annexe E). Cette amplification est réalisée de façon à obtenir une quantité d'amplicons proportionnelle à la quantité initiale d'ADNc. Pour chaque gène étudié, les PCR semi-quantitatives ont été réalisées à partir de 5 µL d'ADNc purifiés et dilués au 1/400^{ème} ou d'eau (témoin négatif d'amplification) dans un volume final de 25 µL et selon les conditions précisées en Annexe D. Le gène *RhSAND1* (CL_RO_3818.1-12074664, URGI), codant pour une protéine dont la fonction est inconnue à ce jour et dont l'expression est assez stable entre les différents traitements testés, est utilisé comme gène de référence.

Les produits d'amplification (10 µL) sont ensuite observés par migration en gel d'agarose (pourcentage précisé en Annexe E) et visualisés sous lumière UV à l'aide de BET comme décrit page 35. Leur taille est alors estimée à l'aide du marqueur de masse moléculaire SmartLadder™ (Eurogentec).

RT-PCR quantitative en temps réel

La RT-PCR quantitative en temps réel est une technique de RT-PCR couplée à un système rapporteur utilisant des fluorophores. Cette technique permet de mesurer en temps réel la quantité d'ADNc amplifiée au cours de la réaction de RT-PCR. Nous allons ainsi pouvoir quantifier le taux de transcrit d'un gène donné dans la phase exponentielle d'amplification durant laquelle la quantité d'ADNc est proportionnelle à la quantité initiale de matrice.

Les réactions de RT-PCR quantitative en temps réel ont été réalisées à partir de 5 µL d'ADNc purifiés et dilués au 1/400^{ème} ou d'eau (témoin négatif) avec des amorces gène spécifiques (Annexe E) et du iQ™ SYBR® Green Supermix (Biorad, France) dans un volume final de 25 µL comme décrit en Annexe K. Le iQ™ SYBR® Green Supermix contient des dNTPs, du tampon de réaction, de la *Taq* polymérase et du SYBR green. C'est le SYBR green, dont la fluorescence est fortement augmentée lorsqu'il se fixe dans de l'ADN double brin, qui sert de système rapp-

orteur. Les réactions de PCR ainsi que la détection des fluorescences émises est effectuée à l'aide du Chromo4 Real Time PCR System (Biorad). Les données sont collectées à l'aide du logiciel Opticon monitor. Chaque réaction est réalisée en triplicata sur 3 lots biologiques indépendants. Le gène *RhSAND1*, homologue du gène *AtSAND* (At2g28390) qui est décrit comme ayant un niveau d'expression stable en réponse à la lumière (Czechowski et al., 2005) est utilisé comme gène de référence. Ce gène a été sélectionné car il est le plus stable parmi les différents gènes de référence (*RhEF1alpha*, *RhGAPDH*, *RhSAND1* et *RhTubulin1*) que nous avons testé pour leur stabilité d'expression sur nos échantillons à l'aide du logiciel Genorm (Vandesompele et al., 2002).

La quantité relative (R) de transcrits du gène cible par rapport au gène de référence est ensuite calculée à l'aide de la formule :

$$R = \frac{(E_{\text{cible}})^{\Delta\text{CP cible (contrôle - traité)}}}{(E_{\text{référence}})^{\Delta\text{CP référence (contrôle - traité)}}$$

où E est égal à l'efficacité des amorces et CP (crossing point) au nombre de cycles de PCR à partir duquel le signal de fluorescence sort du bruit de fond (Pfaffl, 2001). Le seuil utilisé pour déterminer les CP est fixé arbitrairement à 0,05 unités de fluorescence (dans le logiciel Opticon Monitor). A ce seuil, le signal de fluorescence sort du bruit de fond et se trouve dans la phase exponentielle d'amplification.

L'efficacité des différents couples d'amorces est précisée en Annexe E. Elle est calculée à l'aide de la formule :

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

Dans cette formule, la pente correspond à celle de la droite de corrélation :

$$Ct = f(\log \text{ du nombre de copies du gène})$$

lorsqu'on réalise une gamme de dilution d'ADNc extraits de bourgeons (1/300^{ème}, 1/400^{ème}, 1/1000^{ème}, 1/2000^{ème} et 1/4000^{ème}) et que l'on considère qu'il y a une copie du gène étudié dans la dilution la plus élevée.

3.2.5 Validation de la fonction co-transporteur saccharose / H⁺ de Rh-SUC2

La validation fonctionnelle de RhSUC2 consiste à exprimer sa séquence codante complète en système hétérologue (chez la levure) afin de valider sa fonction en tant que transporteur de saccharose et de déterminer toutes ses propriétés cinétiques.

La séquence codante (CDS) de *RhSUC2* est amplifiée par PCR à l'aide d'amorces spécifiques du gène additionnées des sites de restriction EcoRI (extrémité 5') et XhoI (extrémité 3') à partir de la banque RACE décrite précédemment. Les produits d'amplification sont ensuite clonés dans le vecteur d'expression pDR296 (Annexe L) gracieusement fourni par le Professeur Doris Rentsch (Université de Bern, Suisse) et dérivé du vecteur pDR196 (Rentsch et al., 1995). Ce vecteur comporte le gène de sélection à l'ampicilline, le gène d'auxotrophie au tryptophane (TRP1) et permet d'insérer le gène d'intérêt dans un site multiple de clonage compris entre le promoteur PMA et le terminateur ADH. Il peut ainsi être utilisé pour compléter la souche de *Saccharomyces cerevisiae* SUSY7 (*suc2* : :*URA3 malO leu2 trpl/YIP128A2-SUSY*) (Riesmeier et al., 1992).

En temps normal, les levures *Saccharomyces cerevisiae* sécrètent une invertase pariétale (enzyme extracellulaire permettant de dégrader le saccharose en glucose + fructose) et possèdent des transporteurs d'hexoses plasmalemmiques leur permettant d'absorber ces produits de dégradation pour les utiliser comme source de carbone et d'énergie. La souche *S. cerevisiae* SUSY7 est mutée pour le gène de l'invertase pariétale et elle a intégré un gène codant une saccharose synthase végétale : autre enzyme de dégradation du saccharose intracellulaire. Par conséquent, les levures SUSY7 sont incapables de se développer sur un milieu contenant du saccharose comme seule source de carbone et d'énergie si elles n'ont pas été complémentées avec un transporteur de saccharose fonctionnel.

3.2.5.1 Construction utilisée pour l'expression de *RhSUC2* en levure

Le CDS de *RhSUC2* est amplifié à partir de la banque RACE avec les amorces RhSUC2-CDS-S (GAG AGA ATT CCC AGC AAT GGA AGT CGA AAC CAC CCA) et RhSUC2-CDS-AS (GAG ACT CGA GCG ATC GAA ATC AGT GGA ATG CAG CAG CT) selon les mêmes modalités que pour l'amplification des extrémités 5' et 3' de l'ADNc *RhSUC2* pleine longueur (décrites page 36). Les produits de PCR (600 ng) ainsi que le vecteur pDR296 (1 µg) sont ensuite digérés par les enzymes de restriction EcoRI et XhoI (Promega, France), selon les recommandations du fabricant dans un volume final de 20 µL et pendant une nuit à 37°C. Le pDR296 digéré est déphosphorylé par ajout d'1 µL de Thermosensitive Alkaline Phosphatase (TSAP, Promega) au mélange réactionnel de digestion enzymatique et incubation 30 min à 37°C. Cette déphosphorylation permet d'empêcher la recircularisation du plasmide après digestion. Les réactions de digestion et déphosphorylation sont ensuite stoppées par une incubation de 10 min à 65°C. Le CDS de *RhSUC2* et le pDR296 digérés (52,5 ng et 40 ng respectivement) sont ligués selon un rapport 1 :5 (vecteur :insert) à l'aide de 6 unités de T4 DNA ligase (Promega) et de tampon de ligation (1X final) dans un volume final de 10 µL, pendant une nuit à température ambiante. Les produits de ligation sont utilisés pour transformer les *E. coli* JM109 comme décrit en Annexe H afin d'être multipliés, criblés et séquencés. Le pDR296 ayant intégré le CDS de *RhSUC2* sans erreur de séquence est ensuite isolé par minipréparation d'ADN plasmidique à l'aide du kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey Nagel) et conservé à -20°C. La souche d'*E. coli* transformée avec ce vecteur est également conservée sous forme de stock glycérol 1 :1 (souche :glycérol) à -80°C.

3.2.5.2 Transformation des levures

La transformation des levures SUSY7 est réalisée à partir de 2,5 µg de pDR296 vide ou ayant inséré le CDS de *RhSUC2* selon le protocole décrit en Annexe M. Les levures transformées sont criblées par PCR sur colonies. Les transformants ayant intégré les constructions souhaitées sont cultivés sur milieu Yeast Nitrogen Base (YNB DIFCO 1,7 g.L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 37,8 mM) additionné de 2% de glucose et conservés sous forme de stock glycérol 1 :1 (souche :glycérol) à -80°C.

3.2.5.3 Test en goutte

Le test en goutte consiste à suivre le développement des souches de levures SUSY7 transformées avec les différentes constructions plasmidiques (contenant ou non la séquence d'un transporteur de saccharose) sur milieu en présence de saccharose comme seule source de carbone et d'énergie, puis de déterminer si la souche retrouve le phénotype sauvage. Si la souche SUSY7 arrive à se développer normalement, c'est que la complémentation a fonctionné et que le transporteur qu'elle a intégré est fonctionnel.

Les levures SUSY7 transformées avec le pDR296 vide ou ayant intégré le CDS de *RhSUC2* sont cultivées une nuit dans du milieu YNB liquide (YNB DIFCO 1,7 g.L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 37,8 mM) additionné de 2% de glucose à 28°C et sous agitation 200 rpm. Lorsque la culture est en phase exponentielle de croissance (DO_{600 nm} = 0,6 - 0,8), les cellules sont centrifugées, lavées deux fois à l'eau et reprises dans de l'eau de sorte à obtenir une suspension à 10⁶ cellules.mL⁻¹. Une gamme de dilution allant de 10⁵ cellules.mL⁻¹ à 10² cellules.mL⁻¹ est ensuite réalisée et 10 µL de chaque dilution est déposée sur milieu YNB solide additionné de 2% de glucose ou de saccharose. Les levures sont cultivées une nuit à 28°C, leur croissance est observée et elles sont photographiées.

Absorption de saccharose par les levures

La fonctionnalité du transporteur de saccharose RhSUC2, ainsi que ses propriétés cinétiques sont déterminés par une expérience d'absorption de saccharose radiomarqué effectuée sur des levures SUSY7 transformées avec le vecteur pDR296 vide ou ayant intégré le CDS de *RhSUC2*. Le protocole utilisé est détaillé en Annexes N.

Les levures sont cultivées sur milieu Yeast Nitrogen Base liquide (YNB DIFCO 1,7 g.L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 37,8 mM) additionné de 2% de glucose, pendant une nuit à 28°C sous agitation 200 rpm et dans un volume de 20 à 25 mL. Lorsqu'elles sont en phase exponentielle de croissance (DO_{600 nm} = 0,6 - 0,8), elles sont centrifugées 5 min à 3000 rpm. Le surnageant est retiré puis les cellules sont rincées par 2 lavages successifs dans un volume d'eau (20 à 25 mL). Les cellules sont suspendues dans du tampon MES 50 mM, pH 4.5 (ou dans de l'eau pour les expériences de dépendance au pH) de façon à obtenir une DO_{600 nm} au 1/10^{ème} = 0,3. Les cellules sont ensuite conservées à 4°C pour empêcher leur développement le temps de l'expérience. 100 µL de cellules sont ajoutés à 100 µL d'une solution d'incubation contenant le saccharose radiomarqué (5 mM, 0,5 µCi/mL, 18,43 GBq.mmol⁻¹, PerkinElmer) et éventuellement des sucres non marqués en excès (saccharose, glucose, fructose ou maltose à 50 mM) ou des inhibiteurs (CCCP 100 µ M ou PCMBBS 200 µ). Le tout est homogénéisé au vortex et immédiatement placé à 28°C pour une incubation de 2 min. L'incubation est arrêtée par ajout de deux fois 4 mL d'eau glacée, homogénéisation au vortex et filtration sur du papier de verre 25 mm (Fisher Bio-block, EU) à l'aide d'une pompe à vide. Le filtre est placé dans un tube à scintillation de 5 mL. L'expérience est répétée pour tous les points testés. Les filtres sont séchés 30 min à température ambiante. Les filtres sont incubés 30 min dans 4 mL de liquide à scintillation (Ecolite(+)TM) puis les solutions homogénéisées au vortex. Les tubes à scintillation sont placés dans le compteur et la mesure de radioactivité est réalisée. Chaque expérience est réalisée en quadrata sur au moins deux lots biologiques différents.

3.2.6 Analyses bioinformatiques des séquences nucléiques et protéiques

3.2.6.1 Recherche de séquences

Les séquences de nucléiques de rosiers ont été obtenues à partir d'une recherche dans les bases de données URGI (Unité de Recherche en Génomique Info, France, <http://urgi.versailles.inra.fr/>) et GDR (Genome Database for Rosaceae, EUA, <http://www.rosaceae.org/>). Les séquences nucléiques et protéiques provenant d'autres espèces que le rosier ont été obtenues à partir de la base de donnée NCBI (National Center for Biotechnology Information, EUA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.2.6.2 Alignements de séquences et construction d'arbres phylogénétiques

Les séquences nucléiques et protéiques étudiées ont été alignées à l'aide des programmes d'alignements multiples de séquences global : ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) et local : DIALIGN (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/dialign/>) et visualisées à l'aide du logiciel LaTeX (<http://www.latex-project.org/>).

Les arbres phylogénétiques sont construits à partir des alignements protéiques réalisés avec le programme ClustalW et visualisés à l'aide du programme Treeview (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>).

3.2.6.3 Analyse de la séquence protéique prédite de RhSUC2

L'analyse des domaines protéiques connus, du poids moléculaire et du poids isoélectrique de RhSUC2 a été réalisée à l'aide des programmes PROSITE, ProtParam (<http://expasy.org/tools/>) et HMMTOP (<http://www.enzim.hu/hmmtop/>) respectivement.

3.2.7 Analyses statistiques des résultats

Pour les comparaisons 2 à 2 nous avons utilisés le test de Student (test paramétrique) ainsi que le test de Mann-Whitney (non paramétrique).

Les analyses multivariées ont été réalisées à l'aide d'un test Kruskal-Wallis (non paramétrique) suivi de comparaisons 2 à 2 à l'aide d'un test de Mann-Whitney. Les analyses non paramétriques ont été réalisées à l'aide du package d'analyse de données PAST (PALaeontological STATistics).

3.2.8 Rédaction et mise en page du manuscrit

Ce manuscrit de thèse a été rédigé à l'aide du logiciel LaTeX (<http://www.latex-project.org/>). Les Figures ont été conçues à l'aide des logiciels GIMP (<http://www.gimp.org/>) et Inkscape (<http://inkscape.org/?lang=fr>). Les Tableaux et Annexes ont été créés à l'aide du logiciel OpenOffice (<http://fr.openoffice.org/>).

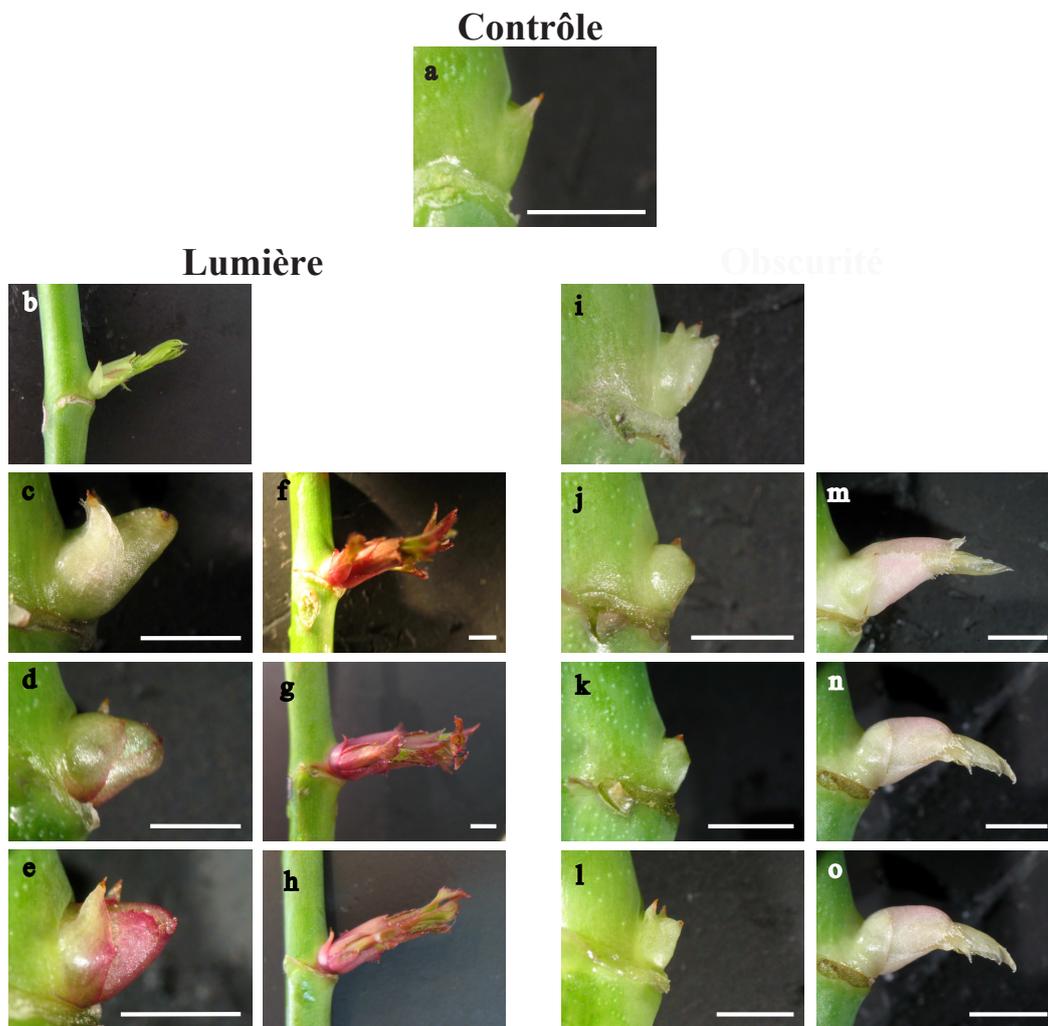


FIGURE 11 – Effet de la décapitation et des sucres sur la morphologie des bourgeons après 6 jours de traitement à la lumière ou à l’obscurité. Les bourgeons sont issus de plantes décapitées (b et i) ou de noeuds cultivés *in vitro* en absence (c et j) ou présence de 250 mM de mannitol (d et k), sorbitol (e et l), saccharose (f et m), glucose (g et n) et fructose (h et o) et exposés à la lumière (b à h) ou à l’obscurité (i à o) pendant 6 jours. Des plantes non traitées sont utilisées comme contrôle avant traitement (a). Les barres d’échelle correspondent à 2 mm.

Chapitre 4

Résultats

4.1 Le bourgeon de rosier : un organe puits

4.1.1 Besoin en sucre des bourgeons pour débourrer

4.1.1.1 A la lumière

Un système de culture *in vitro* de noeuds de rosier nous permet de contrôler l'apport exogène de sucre fourni au bourgeon, afin de déterminer les besoins de ce dernier pour débourrer à la lumière.

Nous avons cultivé à la lumière pendant 6 jours des noeuds de rosier dans un milieu MS en absence de sucre ou en présence de 100, 250 ou 500 mM de mannitol, sorbitol, saccharose, glucose ou fructose.

En parallèle nous avons décapité des plantes et les avons soumises au même traitement lumineux pendant 6 jours. Ceci nous a permis de comparer les résultats obtenus dans le système de culture *in vitro* à ceux obtenus dans le système *in planta*.

La morphologie des bourgeons *in planta* après décapitation, ou cultivés *in vitro* en absence ou présence de différents sucres (250 mM) est présentée en figure 11. Le pourcentage de débourrement, la longueur ainsi que le nombre de pièces foliaires des bourgeons observés avant ou après 6 jours de traitement sont présentés dans le Tableau 2.

Avant le traitement, tous les bourgeons sont dormants. Les écailles sont bien plaquées contre la tige (Figure 11 a), les bourgeons mesurent alors $1,8 \pm 0,3$ mm et présentent en moyenne $9,3 \pm 0,7$ pièces foliaires préformées. On observe, 6 jours après la décapitation, un fort pourcentage de débourrement (90 %) accompagné d'un allongement important du bourgeon ($7,5 \pm 2,8$ mm) et de la formation de 2 nouvelles pièces foliaires ($11,5 \pm 0,8$ pièces) comparativement à la situation observée avant le traitement ($9,3 \pm 0,7$ pièces). Chez les bourgeons qui ont débourré, les feuilles sont bien visibles hors du bourgeon (Figure 11 b).

En système de culture *in vitro* en absence de sucre, la plupart sont en cours de débourrement. Ils sont gonflés, leurs écailles s'écartent et les feuilles stipulaires pointent hors du bourgeon (Figure 11 c). Mais seulement 19 % d'entre eux ont débourré. Ils présentent une organogénèse similaire à celle observée chez les plantes décapitées mais avec un allongement fortement réduit (3,3 mm, soit seulement 26,3 % d'allongement après le traitement).

Tableau 2. Pourcentage de débourrement, longueur et nombre de primordia des bourgeons avant traitement, après 6 jours de culture *in vitro* en présence de sucres ou après décapitation, à la lumière ou à l'obscurité. Des plantes non traitées sont utilisées comme témoins. Les valeurs de longueur des bourgeons et du nombre de primordia indiquent les moyennes \pm l'écart-type de toutes les mesures effectuées pour chaque condition. Les lettres indiquent une différence significativement inférieure (<) ou supérieure (>) par rapport aux portions de tiges cultivées *in vitro* en absence de sucres ($p < 0,01$, Test de Student).

Traitement	Lumière				Obscurité			
	Pourcentage de débourrement	Longueur (mm)	Nombre de primordia	Nombre de plantes	Pourcentage de débourrement	Longueur (mm)	Nombre de primordia	Nombre de plantes
Avant traitement	0	1,8 \pm 0,3 (<)	9,3 \pm 0,7 (<)	18	-	-	-	-
Portions de tige cultivés <i>in vitro</i> avec :								
0 mM sucre	19	3,3 \pm 1,4	11,7 \pm 0,6	16	0	1,4 \pm 0,3	9,5 \pm 0,5	16
100 mM	mannitol	0	1,9 \pm 0,7 (<)	10,3 \pm 0,9 (<)	16	-	-	-
	sorbitol	81	5,3 \pm 1,6 (>)	12,4 \pm 1,0	16	-	-	-
	saccharose	89	10,0 \pm 3,4 (>)	13,1 \pm 0,9 (>)	18	-	-	-
	glucose	94	11,3 \pm 2,0 (>)	14,3 \pm 0,9 (>)	16	-	-	-
	fructose	100	11,5 \pm 1,1 (>)	13,5 \pm 0,7 (>)	16	-	-	-
250 mM	mannitol	0	2,1 \pm 0,4 (<)	11,4 \pm 0,8	16	0	1,3 \pm 0,2	9,6 \pm 0,6
	sorbitol	0	2,1 \pm 0,6 (<)	11,4 \pm 0,8	14	0	1,4 \pm 0,2	9,6 \pm 0,5
	saccharose	100	9,5 \pm 1,4 (>)	15,1 \pm 0,7 (>)	16	81	4,0 \pm 1,4 (>)	11,8 \pm 0,7 (>)
	glucose	94	10,8 \pm 1,5 (>)	15,0 \pm 1,0 (>)	16	81	4,4 \pm 1,4 (>)	11,7 \pm 0,7 (>)
	fructose	100	11,4 \pm 1,5 (>)	14,6 \pm 1,0 (>)	16	71	3,7 \pm 1,7 (>)	11,7 \pm 0,6 (>)
500 mM	mannitol	6	1,6 \pm 0,3 (<)	9,4 \pm 1,7 (<)	16	-	-	-
	sorbitol	0	1,3 \pm 0,2 (<)	9,9 \pm 0,8 (<)	16	-	-	-
	saccharose	75	5,1 \pm 2,7	12,8 \pm 2,0	16	-	-	-
	glucose	100	7,6 \pm 2,2 (>)	14,1 \pm 1,1 (>)	15	-	-	-
	fructose	100	8,7 \pm 2,2 (>)	15,6 \pm 1,5 (>)	16	-	-	-
Plantes décapitées	90	7,5 \pm 2,8 (>)	11,5 \pm 0,8	30	0	1,8 \pm 0,3 (>)	9,4 \pm 0,7	15

Lorsque les bourgeons sont cultivés en présence de mannitol, ils ne débourrent pas. Bien qu'ils soient légèrement gonflés (Figure 11 d), leur longueur et nombre de pièces foliaires sont généralement inchangés par rapport aux bourgeons avant traitement et ce quelle que soit la concentration testée. Leur développement est par conséquent inférieur à celui des bourgeons cultivés en absence de sucre.

Le sorbitol stimule légèrement le développement des bourgeons, mais uniquement pour une concentration de 100 mM, où 81 % des bourgeons débourrent. Ils mesurent $5,3 \pm 1,6$ mm (soit 61,4 % de l'allongement observé chez les plantes décapitées) et présentent un nombre de pièces foliaires similaire à celui observé chez les bourgeons cultivés en absence de sucre. A des concentrations supérieures, l'effet du sorbitol est similaire à celui du mannitol (Tableau 2 et Figure 11 e).

Le saccharose, le glucose et le fructose ont un effet quasiment identique sur le développement des bourgeons excepté à la concentration de 500 mM. Aux concentrations de 100 et 250 mM, ils stimulent le débourrement, l'allongement et l'organogénèse, avec un effet optimum observé à 250 mM. On observe ainsi des pourcentages de débourrement élevés (89, 94 et 100 % respectivement pour 100 mM et de 100, 94 et 100 % pour 250 mM). A ces deux concentrations, la longueur des bourgeons est similaire quel que soit le sucre considéré ($9,5 \pm 1,4$ à $11,5 \pm 1,1$ mm, soit 135 à 170 % d'allongement par rapport aux plantes décapitées). Le nombre de primordia foliaires est également quasiment identique pour une même concentration ($13,1 \pm 0,9$ à $14,3 \pm 0,9$ pièces pour 100 mM et $14,6 \pm 1$ à $15,1 \pm 0,7$ pièces pour 250 mM), mais légèrement supérieur à 250 mM (environ une pièce foliaire supplémentaire). En présence de 250 mM de sucres métabolisables, les bourgeons sont légèrement plus développés que ceux observés en système de plantes décapitées et présentent une plus forte accumulation d'anthocyanes (Figure 11 b, f, g et h). A la concentration de 500 mM, le débourrement reste fortement stimulé (75 % pour le saccharose et 100 % pour le glucose et le fructose). Cependant, à cette concentration, seuls le glucose et le fructose conservent un effet stimulateur sur l'allongement ($7,6 \pm 2,2$ et $8,7 \pm 2,2$ mm respectivement, soit 102 et 121 % en moyenne par rapport aux plantes décapitées) et l'organogénèse ($14,1 \pm 1,1$ et $15,6 \pm 1,5$ pièces respectivement).

Nous avons constaté qu'à la lumière et sur une durée de 6 jours, les bourgeons nécessitent un apport exogène de sucre pour débourrer. Cependant, même en absence d'un apport exogène de sucre, l'organogénèse et l'allongement des bourgeons prennent place (Tableau 2). Nous avons donc étudié leur développement *in vitro* en absence de sucre ou en présence de 250 mM de saccharose sur une durée plus longue (12 jours) (Tableau 3). Au bout de 12 jours, la totalité (100 %) des bourgeons ont alors débourré, même en absence de sucre. Ils mesurent alors $8,6 \pm 0,9$ mm en longueur et $10,5 \pm 2,4$ mm en largeur. Cependant, les bourgeons cultivés en présence de saccharose sont significativement plus développés. Ils sont à la fois plus longs ($11,6 \pm 1,5$ mm) et plus larges ($15,8 \pm 1,7$ mm), ce qui représente 144 % d'allongement et 150 % d'élargissement par rapport aux bourgeons cultivés sur milieu en absence de sucre. Ils présentent un nombre de pièces foliaires plus important (environ une pièce supplémentaire) ainsi que des méristèmes floraux en cours de formation (100 %), absents chez les bourgeons cultivés en absence de sucre. Lorsque les bourgeons sont cultivés en absence de sucre, le débourrement n'est donc pas complètement inhibé mais fortement retardé.

Tableau 3. Pourcentage de débourrement, longueur, largeur, nombre de primordia et nombre de méristèmes floraux des bourgeons après 12 jours de culture *in vitro* en absence ou présence de saccharose, à la lumière ou à l'obscurité. Les valeurs de longueur et largeur des bourgeons et du nombre de primordia indiquent les moyennes \pm l'écart-type de toutes les mesures effectuées pour chaque condition. Les astérisques indiquent une différence significative par rapport aux portions de tiges cultivées *in vitro* en absence de sucres ($p < 0,01$, Test de Student).

Traitement	Lumière					
	Pourcentage de débourrement	Longueur (mm)	Largeur (mm)	Nombre de primordia	Nombre de plantes avec un méristème floral	Nombre de plantes
Portions de tige cultivés <i>in vitro</i> avec :						
0 mM sucre	100	8,6 \pm 0,9	10,5 \pm 2,4	10,2 \pm 0,6	0	16
250 mM saccharose	100	11,6 \pm 1,5*	15,8 \pm 1,7*	11,4 \pm 0,5*	16	16
Traitement	Obscurité					
	Pourcentage de débourrement	Longueur (mm)	Largeur (mm)	Nombre de primordia	Nombre de plantes avec un méristème floral	Nombre de plantes
Portions de tige cultivés <i>in vitro</i> avec :						
0 mM sucre	0	1,7 \pm 0,2	-	8,1 \pm 0,9	0	10
250 mM saccharose	100	14,9 \pm 4,1*	-	11,8 \pm 0,8*	1	16

4.1.1.2 A l'obscurité

En système de plantes décapitées, la lumière est indispensable au débourrement (Girault et al., 2008). Nous avons cultivé des bourgeons pendant 6 jours à l'obscurité en présence ou absence de 250 mM de mannitol, sorbitol, saccharose, glucose et fructose. En parallèle, nous avons décapité des plantes et les avons cultivées dans les mêmes conditions. La morphologie ainsi que les caractéristiques de développement des bourgeons sont présentées dans la Figure 11 et le Tableau 2.

Chez les plantes décapitées cultivées à l'obscurité on observe que les bourgeons sont légèrement gonflés mais n'ont pas débourré (Figure 11 i). Leur longueur ($1,8 \pm 0,3$ mm) et nombre de pièces foliaires ($9,4 \pm 0,7$ pièces) sont identiques à ceux des bourgeons avant traitement. Les bourgeons cultivés *in vitro* en absence de sucre ou en présence de sucres non métabolisables (mannitol et sorbitol) présentent la même morphologie et les mêmes caractéristiques que les bourgeons en système de plantes décapitées (Figure 11 j, k et l, Tableau 2). Ils mesurent entre $1,3 \pm 0,2$ et $1,4 \pm 0,3$ mm et présentent entre $9,5 \pm 0,5$ et $9,6 \pm 0,6$ pièces foliaires. En revanche, les bourgeons cultivés en présence de saccharose, glucose ou fructose présentent un fort pourcentage de débourrement (71 à 81 %). Ils sont significativement plus longs ($4 \pm 1,4$; $4,4 \pm 1,4$ et $3,7 \pm 1,7$ mm respectivement) que les bourgeons cultivés en absence de sucre ($1,4 \pm 0,3$ mm) et ont produit environ 2 pièces foliaires supplémentaires. D'un point de vue morphologique, les bourgeons présentent des feuilles caractéristiques pointant hors du bourgeon et une forte dépigmentation (Figure 11 m, n et o).

Lorsque l'on compare le développement à l'obscurité des bourgeons cultivés en présence de sucres métabolisables aux bourgeons du système de plantes décapitées à la lumière, on note que l'effet des sucres à l'obscurité mime partiellement l'effet de la décapitation à la lumière (organogénèse identique mais allongement intermédiaire) (Tableau 2).

Des bourgeons ont également été cultivés *in vitro* à l'obscurité en absence de sucre ou en présence de 250 mM de saccharose pendant 12 jours (Tableau 3). En absence de sucre, tous les bourgeons sont restés au même stade de développement qu'avant le traitement. Ils n'ont pas débourré, ne présentent pas d'allongement ($1,7 \pm 0,2$ mm) ou d'organogénèse ($8,1 \pm 0,9$ pièces foliaires). En revanche, ceux cultivés en présence de saccharose ont tous débourré et présentent un fort allongement ($14,9 \pm 4,1$ mm, ils sont donc 8,7 fois plus longs que les bourgeons cultivés en absence de sucre). Leur organogénèse est également stimulée (formation de 3 et 4 pièces foliaires supplémentaires). Parmi l'ensemble des bourgeons étudiés, un seul présente l'ébauche d'un méristème floral.

4.1.2 Teneur en sucres dans les bourgeons cultivés *in vitro* en absence ou présence de sucres exogènes

Les dosages de glucose, fructose, saccharose et amidon ont été réalisés par voie enzymatique sur des bourgeons cultivés *in vitro*, à la lumière ou à l'obscurité, en absence de sucres ou en présence de 250 mM de mannitol, saccharose ou glucose pendant 72 h (Figure 12). Des plantes au stade BFV non traitées, dont les bourgeons sont dormants, sont utilisées comme témoins.

4.1.2.1 Teneur en sucres des bourgeons cultivés à la lumière

Avant traitement, les bourgeons ont des teneurs en glucose, fructose, saccharose et amidon de $1,15 \pm 0,23$; $0,78 \pm 0,11$; $7,36 \pm 2,46$ et $0,45 \pm 0,21$ mg/g de matière fraîche respectivement.

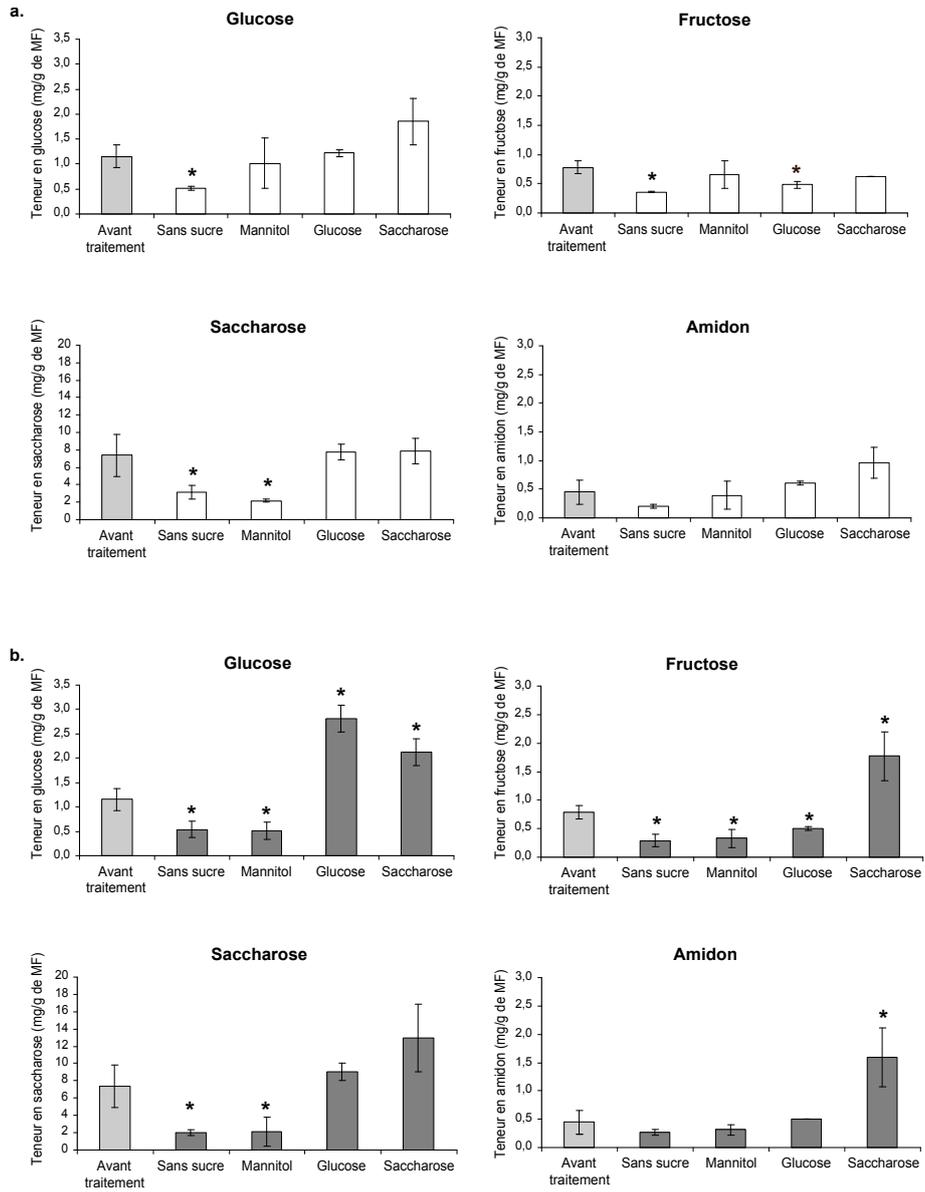


FIGURE 12 – Teneur en sucre dans les bourgeons cultivés *in vitro* en absence ou présence de sucres pendant 72 h à la lumière (a) ou à l’obscurité (b). Les bourgeons sont cultivés en absence de sucre ou en présence de 250 mM de mannitol, saccharose ou glucose. Des plantes non traitées sont utilisées comme témoins avant traitement. Chaque valeur représente la moyenne de 3 lots de bourgeons. Les astérisques indiquent les différences significatives par rapport au témoin non traité ($p < 0,05$).

A la lumière, après 72 h de culture *in vitro* sur un milieu dépourvu de sucres, on observe une diminution significative des quantités de glucose ($0,52 \pm 0,04$ mg/g de matière fraîche, soit 2,2 fois), de fructose ($0,36 \pm 0,01$ mg/g de matière fraîche, soit 2,2 fois) et de saccharose ($3,14 \pm 0,75$ mg/g de matière fraîche, soit 2,3 fois) dans les bourgeons par rapport aux quantités observées dans les bourgeons avant le traitement (Figure 12 a). Les bourgeons cultivés en présence de mannitol présentent quant à eux une diminution de la quantité en saccharose uniquement ($2,18 \pm 0,16$ mg/g de matière fraîche, soit 3,4 fois). Chez les bourgeons cultivés en présence de glucose, seule la quantité de fructose diminue légèrement ($0,5 \pm 0,03$ mg/g de matière fraîche, soit 1,6 fois). Enfin, les bourgeons cultivés en présence de saccharose ne présentent pas de variation significative de la quantité de sucres qu'ils ont accumulé, bien que l'on observe une tendance à l'augmentation des quantités de glucose ($1,85 \pm 0,45$ mg/g de matière fraîche) et d'amidon ($0,96 \pm 0,27$ mg/g de matière fraîche). A la lumière, la teneur en amidon des bourgeons ne varie pas significativement par rapport au témoin avant traitement, quel que soit le traitement considéré.

4.1.2.2 Teneur en sucres des bourgeons cultivés à l'obscurité

A l'obscurité, après 72 h de culture *in vitro* en absence de sucre, on observe une diminution significative des quantités de glucose ($0,54 \pm 0,16$ mg/g de matière fraîche, soit 2,1 fois), de fructose ($0,29 \pm 0,11$ mg/g de matière fraîche, soit 2,7 fois) et de saccharose dans les bourgeons ($2,01 \pm 0,37$ mg/g de matière fraîche, soit 3,7 fois) (Figure 12 b). En présence de 250 mM mannitol (sucre non métabolisable), on observe également une diminution des quantités de ces mêmes sucres : 2,2 ; 2,3 et 3,4 fois respectivement. Les bourgeons cultivés en présence de glucose présentent une nette augmentation de sa quantité (2,4 fois soit $2,81 \pm 0,27$ mg/g de matière fraîche) et une légère diminution de la quantité de fructose (1,6 fois soit $0,5 \pm 0,03$ mg/g de matière fraîche). Les bourgeons cultivés à l'obscurité en présence de saccharose accumulent significativement plus de glucose ($2,13 \pm 0,28$ mg/g de matière fraîche, soit 1,8 fois), de fructose ($1,77 \pm 0,43$ mg/g de matière fraîche, soit 2,3 fois) et d'amidon ($1,6 \pm 0,52$ mg/g de matière fraîche, soit 3,5 fois) que les bourgeons non traités.

4.1.3 Accumulation de sucres par les bourgeons exposés à la lumière ou à l'obscurité après la décapitation

Nous avons mesuré l'accumulation de sucres radiomarqués par les bourgeons issus de plantes décapitées et placées à la lumière ou à l'obscurité pendant 72 et 96 h. Les bourgeons ont été incubés sur un milieu gélosé contenant du saccharose, du glucose ou du fructose radiomarqués. La quantité de radioactivité incorporée par les tissus a ensuite été mesurée (Figure 13).

Les bourgeons dormants accumulent le fructose ($10,23$ Bq.bourgeon⁻¹) en plus grande quantité que le saccharose ($4,62$ Bq.bourgeon⁻¹) et le glucose ($1,76$ Bq.bourgeon⁻¹). L'accumulation de fructose est uniquement induite dans les bourgeons exposés à la lumière après la décapitation, et ce de manière durable entre 72 et 96 h (2,1 et 2,3 fois). Cette induction, comme pour les autres flux de sucres, perdure 96 h après la décapitation.

L'accumulation de saccharose augmente dans les bourgeons exposés à la lumière (2,7 fois) comme à l'obscurité (1,7 fois) 72 h après décapitation. Cette augmentation est relativement stable jusqu'à 96 h, où elle devient significativement plus importante à la lumière (2,6 fois) qu'à l'obscurité (1,5 fois).

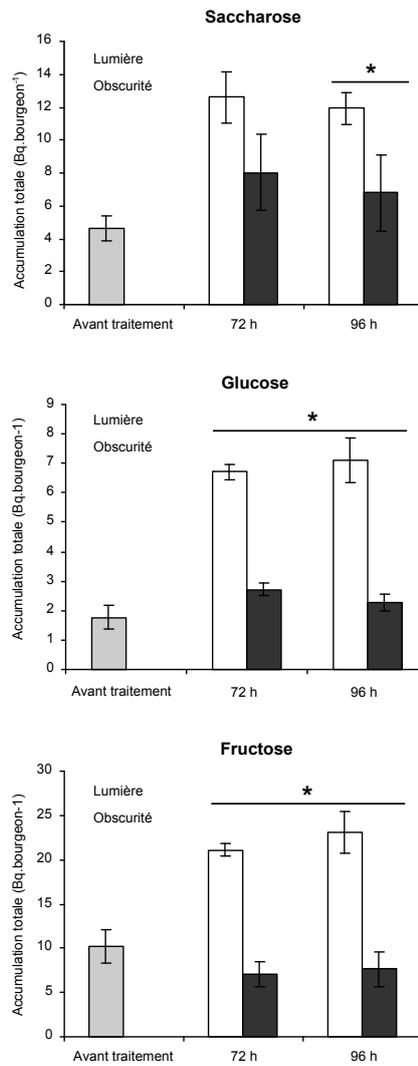


FIGURE 13 – Accumulation total de saccharose, glucose et fructose radiomarqués dans les bourgeons 72 et 96 h après décapitation et exposition à la lumière ou à l’obscurité. Des plantes non traitées sont utilisées comme témoins avant traitement. Les bourgeons sont incubés pendant 2 h en présence de $0,5 \mu\text{Ci.mL}^{-1}$ de sucres radiomarqués. Chaque valeur représente la moyenne de 3 lots de bourgeons. Les lettres indiquent les groupes de différences significatives ($p < 0,05$).

Tableau 4. Pourcentage d'absorption de saccharose et de glucose radiomarqués par les bourgeons en présence de 0,5 μ M de CCCP par rapport aux bourgeons non traités au CCCP. Les mesures sont réalisées sur des bourgeons issus de plantes non décapitées (bourgeons dormants, témoin avant décapitation) ou décapitées et placées 72 h à la lumière ou à l'obscurité.

	Pourcentage d'absorption			
	Saccharose		Glucose	
	Sans CCCP	Avec CCCP	Sans CCCP	Avec CCCP
Non décapitées	100	42,78	100	83,25
72 h après décapitation et exposition à la lumière	100	55,52	100	75,10
72 h après décapitation et exposition à la l'obscurité	100	42,61	100	73,81

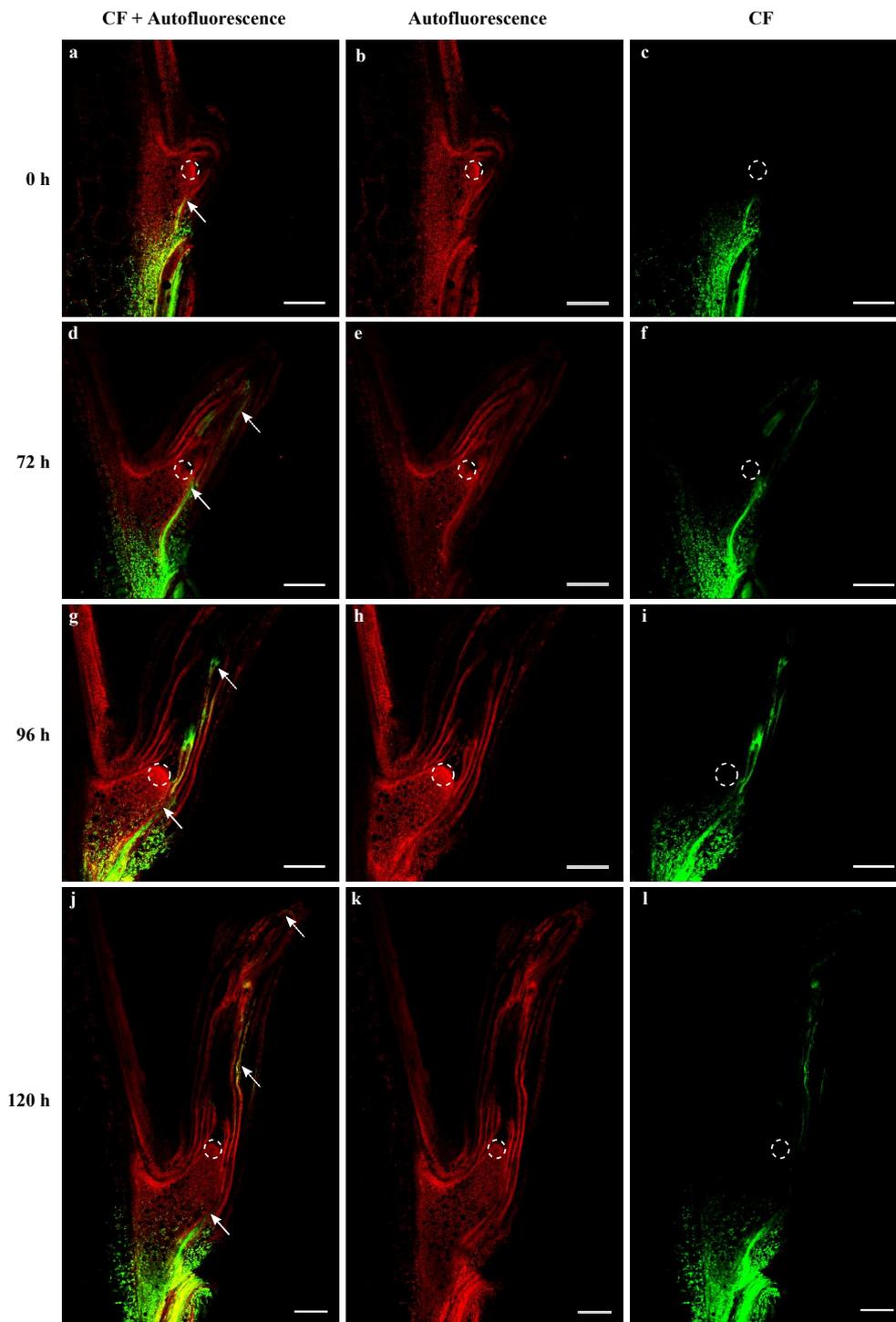


FIGURE 14 – Bourgeons marqués à la CF. Des bourgeons dormants (0 h après décapitation, a-c) ou en cours de débourrement (exposés 72 à 120 h en présence de lumière après décapitation, d-l) sont marqués à la CF ($500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Ils sont ensuite observés au microscope confocal à balayage laser. La superposition (a, d, g et j) de l'autofluorescence des tissus (b, e, h et k) et de la fluorescence de la CF (c, f, i et l) permet de localiser le marquage dans le bourgeon. La zone méristématique est entourée par des pointillés. Les flèches pleines indiquent l'extrémité des faisceaux conducteurs fonctionnels qui alimentent le bourgeon. Les flèches pointillées indiquent la vascularisation des jeunes feuilles. Les barres d'échelle correspondent à $500 \mu\text{M}$.

L'accumulation de glucose est fortement et durablement augmentée à 72 h (3,8 fois) et 96 h (4 fois) après la décapitation chez les bourgeons exposés à la lumière. Cette induction est significativement plus faible chez les bourgeons placés à l'obscurité (environ 1,5 et 1,3 fois respectivement), mais reste également stable sur la durée de l'expérience.

Nous avons également incubé des bourgeons en présence de sucres radiomarqués et de 0,5 μM de CCCP, un découplant du gradient de proton, afin de déterminer si l'absorption des sucres par les bourgeons implique l'intervention de cotransporteurs sucre/ H^+ . Les mesures ont été réalisées uniquement pour l'absorption de saccharose et de glucose. Les résultats sont présentés dans le Tableau 4.

A la concentration de 0,5 μM , le CCCP inhibe partiellement l'absorption de saccharose, ainsi que celle du glucose. L'effet inhibiteur du CCCP semble plus important sur l'absorption de saccharose que sur celle du glucose. L'absorption de saccharose est notamment inhibée de 1,8 à 2,3 fois en fonction du traitement considéré, alors que celle du glucose est seulement inhibée de 1,2 à 1,3 fois.

4.1.4 État des connexions symplasmiques entre la tige et le bourgeon

Nous avons étudié l'état des connexions symplasmiques dans des bourgeons dormants (0 h après décapitation) et en cours de débourrement (72 à 120 h d'exposition à la lumière après décapitation). La sève phloémienne a été marquée à l'aide d'un traceur fluorescent : la carboxyfluorescéine (CF). Des bourgeons marqués à l'eau servent de témoins négatifs de fluorescence pour la CF. Les bourgeons ont été observés au microscope confocal à balayage laser. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 14 et 15.

Les bourgeons marqués à l'eau n'émettent aucun signal de fluorescence lorsqu'ils sont excités à 488 nm (donnée non représentée). Le signal détecté à la suite de l'excitation est donc spécifique de la CF. Dans les bourgeons dormants, on observe à la base du bourgeon une connexion vasculaire qui aboutit un peu en dessous des jeunes primordia (Figure 14 a-c). Le signal diffuse alors légèrement dans les tissus adjacents aux faisceaux conducteurs et dans la base des écailles et des feuilles les plus âgées. Les écailles et jeunes feuilles des bourgeons dormants ne présentent quant à eux jamais de connexions vasculaires (Figure 15).

Après la décapitation, les bourgeons exposés à la lumière s'allongent progressivement entre 72 et 120 h (Figure 15). Dès 72 h après la décapitation on observe le développement de la vascularisation à la base du bourgeon, de manière concomitante avec l'allongement de l'ébauche de tige (Figure 14 d-f). On commence également à détecter une vascularisation des jeunes feuilles chez 33 % des bourgeons observés (Figure 14 d-f et 15). Au bout de 96 et 120 h, les jeunes feuilles du bourgeon sont vascularisées dans 83 et 100 % des cas respectivement (Figure 15). Quelles que soient les conditions testées, aucune fluorescence correspondant à la CF n'est détectée dans la zone méristématique (Figure 14).

4.1.5 Conclusions

A la lumière, 6 jours suffisent pour déclencher un fort pourcentage de débourrement des bourgeons chez les plantes décapitées. En revanche, pour un même traitement lumineux, le débourrement des bourgeons cultivés *in vitro* en absence de sucre est très fortement limité. Ce phénomène est principalement dû à une réduction de l'allongement des bourgeons. Le mannitol,

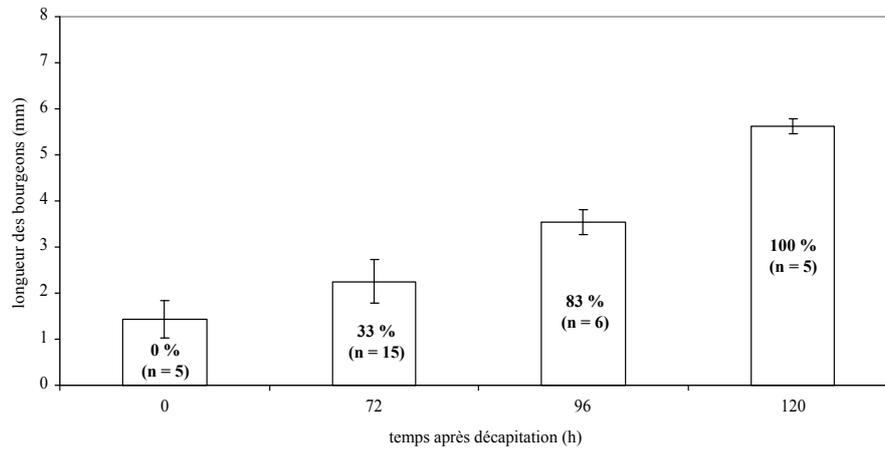


FIGURE 15 – Etat de vascularisation des jeunes feuilles du bourgeon en fonction du développement de ce dernier. Le graphique représente la longueur moyenne des bourgeons (de la cicatrice foliaire à l'extrémité du bourgeon) en fonction du temps d'exposition des plantes à la lumière après la décapitation. Le pourcentage de bourgeons présentant une vascularisation des jeunes feuilles, ainsi que les effectifs sont indiqués dans les histogrammes. Les connexions vasculaires de bourgeons dormants (0 h après décapitation) ou en cours de débourrement (exposées 72 à 120 h en présence de lumière après décapitation) sont mises en évidence à l'aide d'un traceur fluorescent : la CF ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$). L'observation des bourgeons est réalisée à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser.

témoin osmotique, inhibe totalement le débourrement, quelle que soit la concentration testée (100, 250 et 500 mM). Les bourgeons cultivés en présence de sucres métabolisables (saccharose, glucose et fructose) présentent eux un fort pourcentage de débourrement pour les différentes concentrations testées avec un effet optimum à 250 mM. En présence de ces sucres, l'organogénèse ainsi que l'allongement sont fortement stimulés, principalement à 100 et 250 mM. Le sorbitol permet le débourrement des bourgeons à 100 mM uniquement, au delà de cette concentration il l'inhibe totalement. Une observation à plus long terme (12 jours) des bourgeons cultivés en absence d'un apport de sucres exogènes indique que le débourrement n'est pas totalement inhibé, mais fortement retardé.

A l'obscurité, le débourrement est totalement réprimé chez les plantes décapitées, même après 12 jours de traitement. Les bourgeons sont légèrement gonflés mais ne présentent pas d'organogénèse ou d'allongement. En revanche, les bourgeons cultivés 6 jours en présence de 250 mM de sucres métabolisables (saccharose, glucose et fructose) présentent eux un fort pourcentage de débourrement. L'organogénèse ainsi que l'allongement sont alors stimulés. L'effet des sucres est pour une même durée de traitement, moins prononcé à l'obscurité qu'à la lumière.

Les bourgeons cultivés 3 jours à la lumière en absence de sucres présentent une réduction des quantités de saccharose, glucose et fructose. Les sucres solubles endogènes au bourgeon ont donc été consommés. Les bourgeons cultivés en présence de 250 mM mannitol présentent uniquement une réduction de la quantité de saccharose. Enfin, les bourgeons cultivés en présence de glucose présentent une réduction de la quantité de saccharose. La présence de saccharose dans le milieu n'a aucune influence sur la quantité de sucres dans le bourgeon.

Au bout de 3 jours à l'obscurité, les bourgeons cultivés en absence de sucre ou en présence de mannitol présentent une réduction de l'accumulation de saccharose, glucose et fructose. En présence de glucose, les bourgeons accumulent du glucose et utilisent du fructose. Le saccharose stimule quant à lui l'accumulation d'hexoses et d'amidon.

La décapitation et l'exposition des plantes 72 à 96 h à la lumière stimulent l'accumulation de sucres radiomarqués (saccharose, glucose et fructose) dans le bourgeon. L'accumulation d'hexoses est plus fortement stimulée à la lumière qu'à l'obscurité et ce de façon stable entre 72 et 96 h. L'accumulation d'hexoses est significativement supérieure dans les bourgeons exposés à la lumière par rapport à ceux exposés à l'obscurité à 72 et 96 h, alors que celle du saccharose ne l'est qu'au bout de 96 h. L'utilisation d'un protonophore démontre que l'absorption de saccharose et de glucose par les bourgeons fait intervenir une part active de transport (via des transporteurs de sucres). Cette part d'absorption active serait plus importante pour le saccharose que pour le glucose.

Les bourgeons dormants présentent un début de vascularisation dans l'ébauche de tige aux entre-noeuds réduits. Des connexions symplasmiques entre les faisceaux conducteurs et les tissus adjacents (notamment la base des écailles et feuilles les plus âgées) sont également présentes. Cependant, les écailles et les jeunes feuilles ne sont pas encore vascularisées. Chez les bourgeons en cours de débourrement (de 72 à 120 h après décapitation et exposition des plantes à la lumière), on observe un allongement de la tige préformée et le développement progressif de son système vasculaire. Parallèlement, on note la vascularisation progressive des écailles et des jeunes feuilles. Au bout de 120 h après la décapitation, l'ensemble des bourgeons présentent des jeunes feuilles vascularisées. Quelles que soient les conditions testées, la zone méristématique est symplasmiquement isolés du reste de la plante.

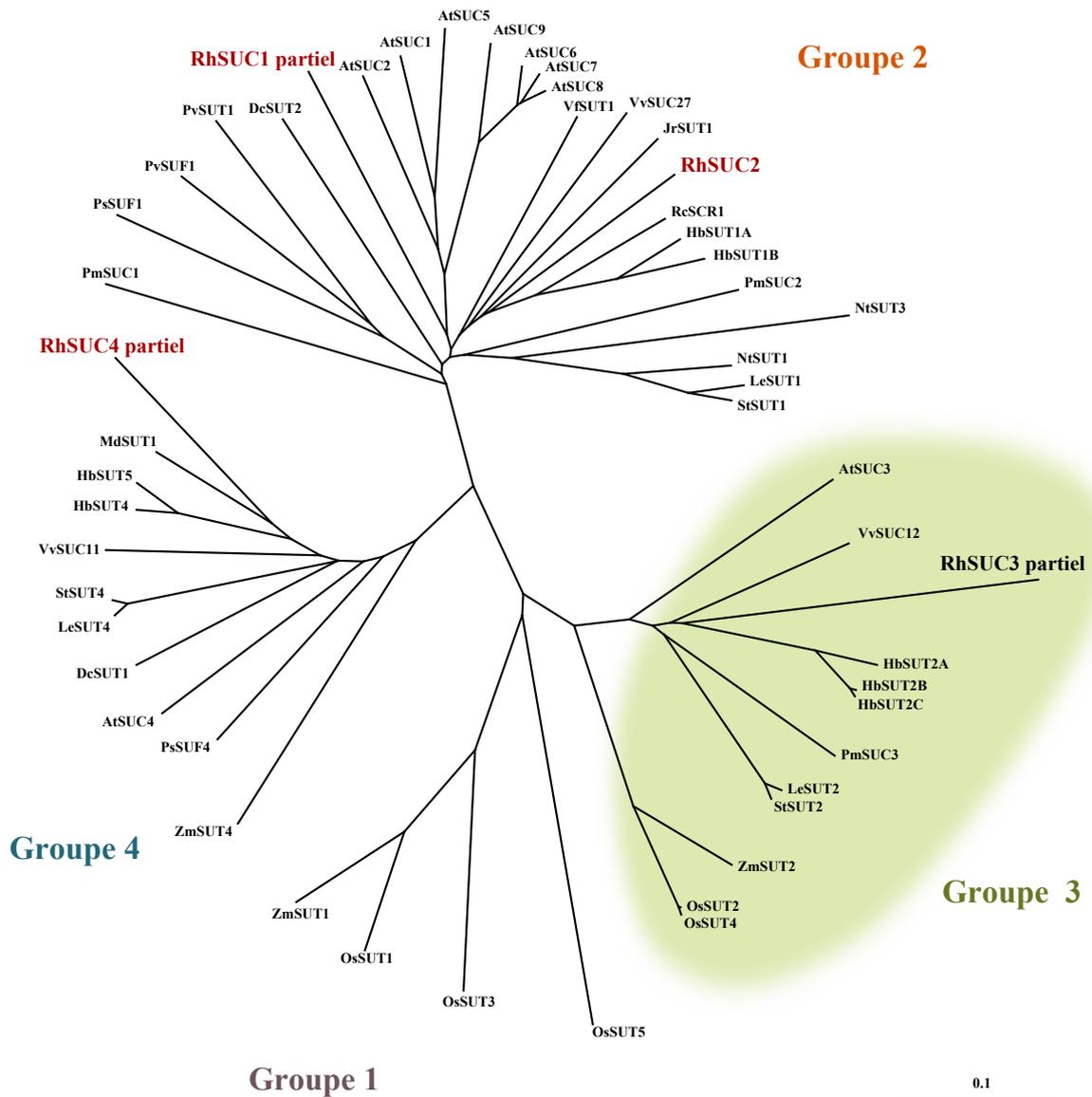


FIGURE 16 – Arbre phylogénétique des transporteurs de saccharose de plantes. Les séquences protéiques prédites complètes ou partielles des transporteurs de saccharose de *Rosa hybrida* ont été comparées aux séquences complètes confirmées ou prédites de transporteurs de saccharose chez différentes plantes. L'arbre phylogénétique a été construit et visualisé à l'aide des logiciels ClustalW et Treeview. Les groupes phylogénétiques définis par Sauer (2007) sont indiqués. Les numéros d'accèsion des différents transporteurs utilisés pour construire l'arbre sont indiqués en Annexe O. Les barres indiquent les distances phylogénétiques.

4.2 Implication des transporteurs de saccharose (SUC) dans le photocontrôle du débourrement

4.2.1 Clonage des séquences et analyses phylogénétiques

Une recherche dans les bases de données GDR (Genome Database for Rosaceae) et URGI (Unité de Recherche Génomique Info) nous a permis d'identifier la région 5' d'une séquence ADNc partielle codant potentiellement pour un transporteur de saccharose chez le rosier : *RhSUC3* (CL_RO._31-83.119612540, 637 pb). Nous avons nommé ce transporteur *RhSUC3* par homologie de séquence avec le transporteur *AtSUC3* chez l'arabette.

Afin d'identifier d'autres transporteurs de saccharose nous avons procédé à l'isolement de séquences d'ADNc partielles. Ces dernières ont été amplifiées par PCR à l'aide d'amorces dégénérées à partir d'ARNm extraits de différents organes de rosier. Elles ont ensuite été clonées et séquencées. Nous avons ainsi identifié 3 nouvelles séquences chevauchantes codant potentiellement pour des transporteurs de saccharose : *RhSUC1* (367 pb, HO762757), *RhSUC2* (755 pb) et *RhSUC4* (397 pb, HO762758). Nous avons par la suite isolé la séquence ADNc complète de *RhSUC2* (1982 pb, HQ403679) par RACE PCR.

L'alignement des séquences ADNc des transporteurs de saccharose isolés chez le rosier avec leurs séquences homologues chez l'arabette est présenté en Annexe P. Les séquences ADNc partielles des gènes *RhSUC1* et *RhSUC4* se chevauchent et s'alignent avec les régions codantes de leurs homologues chez l'arabette. Elles présentent respectivement 69 et 68 % d'homologie avec les séquences ADNc complètes d'*AtSUC1* et *AtSUC4*. La séquence ADNc complète de *RhSUC2* présente 50 % d'homologie avec celles de *AtSUC1* et *AtSUC2*. La séquence ADNc partielle de *RhSUC3* s'aligne avec l'extrémité 5' de la séquence ADNc complète d'*AtSUC3* (la région 5' non traduite + le début de la séquence codante). De ce fait, les deux séquences ne présentent que 33 % d'homologie. L'extrémité 5' de la séquence ADNc complète d'*AtSUC3* est plus longue que celle des autres transporteurs de saccharose chez l'arabette. Il semble en être de même pour la séquence ADNc partielle de *RhSUC3*.

Chez les plantes, les transporteurs de saccharose appartiennent à une famille multigénique dont les différents membres sont impliqués dans divers processus physiologiques et présentent des caractéristiques cinétiques et des localisations cellulaires et tissulaires variables (Sauer, 2007; Kühn et Grof, 2010). Sauer (2007) classe ces transporteurs en 4 groupes. Au sein de ces groupes les caractéristiques structurales et les propriétés cinétiques des transporteurs sont généralement bien conservées. Nous avons réalisé une analyse phylogénétique des séquences protéiques prédites des transporteurs potentiels de saccharose de rosier afin d'avoir une idée de leur rôle potentiel. Leurs séquences ont été comparées à celles de transporteurs de saccharose de diverses espèces végétales. Nous avons notamment fait le choix d'utiliser les séquences d'espèces modèles de Mono- et de Dicotylédones (riz, maïs, arabette, tabac, plantain et tomate), chez lesquelles la fonction des différents transporteurs a été le plus étudiée. Le rosier étant un buisson, nous avons utilisé les séquences de plantes ligneuses (hevea, vigne, noyer). Nous avons également sélectionné la séquence de transporteurs exprimés dans des organes puits (graine, fruit ou bourgeon) ou régulés par la lumière et le rythme circadien. Les résultats de l'analyse phylogénétique sont présentés en Figure 16.

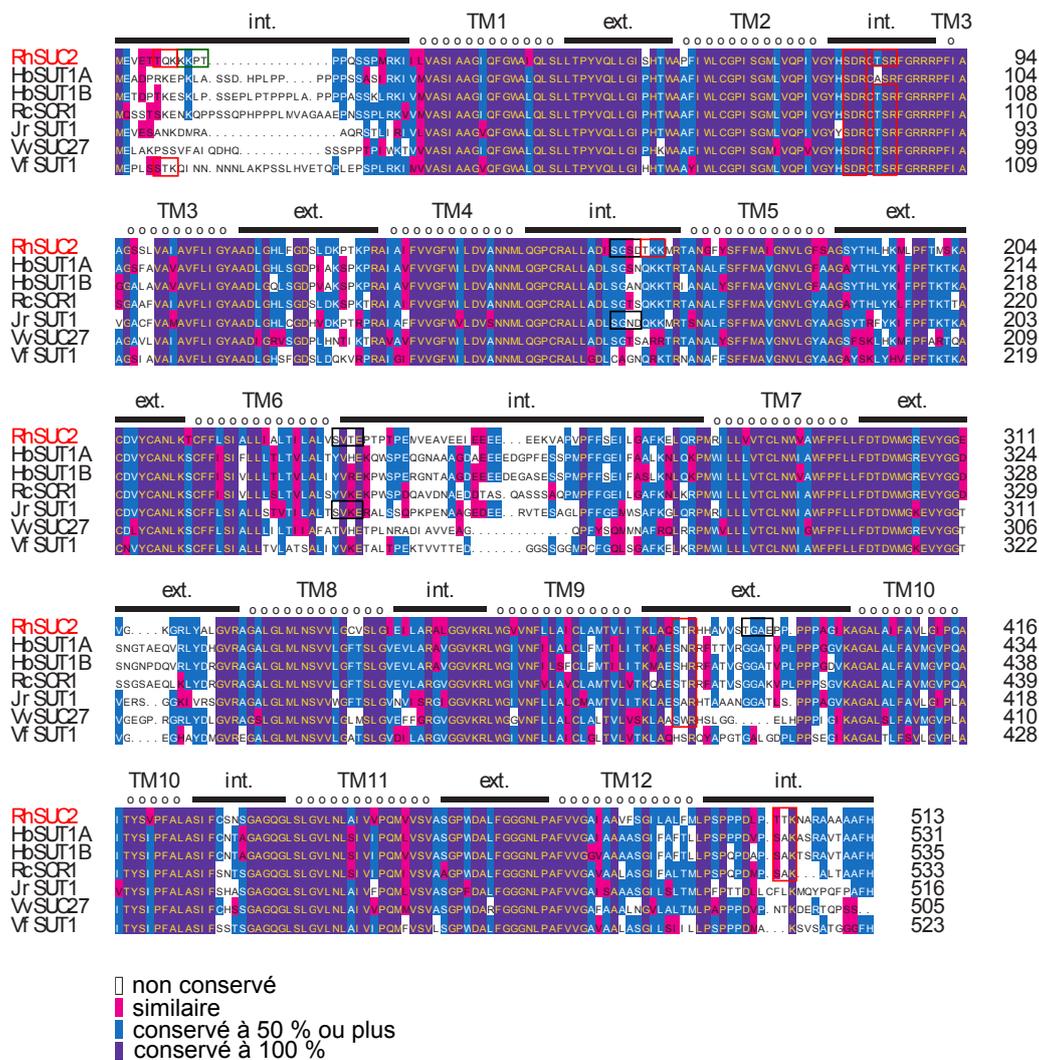


FIGURE 17 – Alignement de la séquence protéique de RhSUC2 avec celles d’autres transporteurs de saccharose. La séquence protéique prédite de RhSUC2 a été comparée aux séquences complètes confirmées ou prédites des transporteurs de saccharose dont RhSUC2 est le plus proche chez d’autres plantes. Le degré de conservation des acides aminés est indiqué en légende. Les domaines intracellulaire (int.), extracellulaires (ext.) et transmembranaires (TM) prédits de RhSUC2 figurent au dessus de l’alignement. Les sites potentiels de phosphorylation de RhSUC2 par la protéine kinase C, la protéine kinase cAMP- et cGMP dépendante et la caséine kinase II (sont encadrés en rouge, vert et noir respectivement). L’alignement des séquences, la prédiction de la structure secondaire et sites de phosphorylation de RhSUC2 et la mise en forme des données ont été réalisées à l’aide des logiciels ClustalW, HMMTOP, Prosite, Latex et Inkscape. Les numéros d’accèsion des différents transporteurs utilisés pour construire l’alignement sont les suivants : HbSUT1A (*Hevea brasiliensis*, DQ985466), HbSUT1B (AM492537), JrSUT1 (*Juglans regia*, AAU11810), RcSCR1 (*Ricinus communis*, CAA83436), RhSUC2 (*Rosa hybrida*, HQ403679), VfSUT1 (*Vicia faba*, CAB07811), VvSUC27 (*Vitis vinifera*, AAF08331).

RhSUC1 fait partie du groupe 2 dans la classification définie par Sauer (2007). Ce groupe représente des transporteurs de saccharose à forte affinité de Dicotylédones localisés dans la membrane plasmique. Ils sont responsables du chargement du phloème, ainsi que de l'importation de sucres dans les cellules puits. HbSUT1A (Yang et al., 2007; Dusotoit-Coucaud et al., 2009) et RcSCR1 (Eisenbarth et Weig, 2005) sont les homologues les plus proches de RhSUC1 (68 et 67 % d'identité respectivement).

RhSUC2 code potentiellement pour une protéine de 513 acides aminés d'une masse moléculaire prédite de 54,6 kDa et d'un pI = 8,62. L'analyse des structures secondaires et des sites potentiels de phosphorylation de sa séquence protéique est présentée en Figure 17. RhSUC2 présente plusieurs caractéristiques communes aux transporteurs de saccharose déjà caractérisés. Il appartient à la super-famille des facilitateurs majeurs (MFS) caractérisée par 12 domaines hélices transmembranaires (Saier, 2000a; Lemoine, 2000), par des extrémités N- et C-terminales cytoplasmiques et par une boucle cytoplasmique centrale localisée entre les segments transmembranaires 6 et 7 (Sauer, 2007). RhSUC2 appartient également au groupe 2 des transporteurs de saccharose. Il partage respectivement 73, 72, 70 et 66 % d'identité avec les transporteurs de saccharose HbSUT1(A et B) (Dusotoit-Coucaud et al., 2009), RcSCR1 (Eisenbarth et Weig, 2005), JrSUT1 (Decourteix et al., 2006) et AtSUC2 (Sauer et Stolz, 1994). La séquence protéique de RhSUC2 présente un fort degré de conservation avec les transporteurs de saccharose qui lui sont le plus proche sur le plan phylogénique (Figure 17). L'extrémité N-terminale et la boucle cytoplasmique centrale sont les zones les moins conservées entre les différents transporteurs. Les domaines extracellulaires entre les domaines transmembranaires (TM) 7-8 et 9-10 et l'extrémité C-terminale intracellulaire de la protéine présentent également un fort degré de variabilité. Des acides aminés non conservés sont également présents de façon isolée dans les TM 3 et 6, du domaine extracellulaire compris entre les TM 3-4 et des domaines intracellulaires compris entre les TM 4-5 et 10-11. RhSUC2 présente des sites potentiels de phosphorylation reconnus par trois types de protéines kinases. Sa séquence comprend six sites potentiels de phosphorylation par les protéines kinases C en position 6, 79, 83, 163, 380 et 501. Parmi ces sites, quatre sont fortement conservés entre les séquences des différents transporteurs de saccharose proches de RhSUC2 : deux sites consécutifs localisés dans le domaine intracellulaire entre les TM 2-3, un dans le domaine extracellulaire entre les TM 9-10 et un dans le domaine intracellulaire C-terminal. La séquence de RhSUC2 présente un site potentiel de phosphorylation par une protéine kinase cAMP et cGMP-dépendante en position 9 (domaine intracellulaire N-terminal, non conservé chez les homologues de RhSUC2). Trois sites potentiels de phosphorylation par la protéine caséine kinase II sont également présents en position 159, 233 et 389. Deux de ses sites, localisés dans les domaines intracellulaires entre les TM 4-5 et 6-7, sont conservés entre les séquences de RhSUC2 et JrSUT1.

RhSUC3 appartient au groupe 3 qui comprend des transporteurs de saccharose membranaires à faible affinité se distinguant des autres par une extension de leur extrémité N-terminale et de leur boucle cytoplasmique centrale. Ces transporteurs présentent des motifs de senseurs de sucres mais aucune preuve directe d'une telle fonction n'a été apportée à ce jour (Sauer, 2007). RhSUC3 présente la plus forte identité de séquence (66 %) avec les transporteurs HbSUT2 (B et C) (Yang et al., 2007; Dusotoit-Coucaud et al., 2009). Il est similaire à 57 % avec le transporteur AtSUC3 (Barker et al., 2000), son plus proche homologue chez l'arabette.

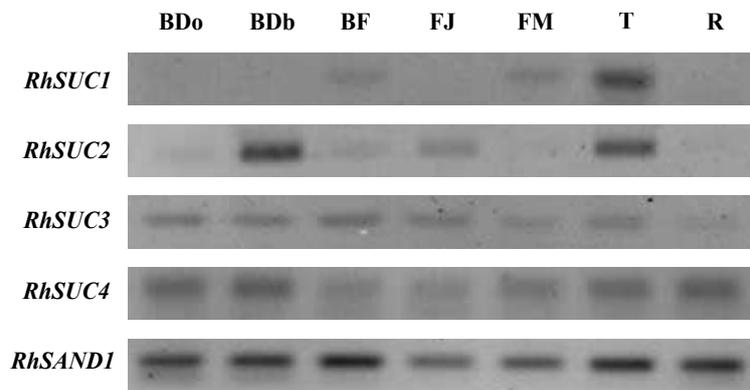


FIGURE 18 – Niveaux d'ARNm des transporteurs de saccharose (*RhSUCs*) dans les différents organes de rosier. Les ARNs extraits des différents organes de rosier : bourgeon dormant (BDo) ou en cours de débourrement (BDb), bouton floral (BF), feuille jeune (FJ) ou mature (FM), tige (T) et racine (R) sont amplifiés par RT-PCR semi-quantitative et visualisés par migration en gel d'agarose. Le gène *RhSAND1*, exprimé de manière stable dans les différents organes, est utilisé comme référence.

Le dernier transporteur isolé, *RhSUC4*, appartient au groupe 4 qui rassemble des transporteurs principalement exprimés dans les tissus puits et dont certains ont été localisés dans le tonoplaste (Sauer, 2007). Les séquences les plus similaires à *RhSUC4* (77 %) sont celles de *HbSUT4* (Yang et al., 2007; Dusotoit-Coucaud et al., 2009) et *MdSUT1* (Fan et al., 2009), ainsi que *AtSUC4* chez *Arabidopsis* (64 %).

4.2.2 Niveaux d'ARNm des SUC dans les différents organes

Nous avons étudié le niveau d'expression des gènes *RhSUCs* dans les différents organes du rosier par RT-PCR semi-quantitative. Les résultats sont présentés en Figure 18.

L'expression du gène de référence *RhSAND1* est assez stable dans les différents organes étudiés, hormis dans les feuilles jeunes et matures où elle est un peu plus faible que dans les autres organes.

Les ARNm du gène *RhSUC1* s'accumulent principalement dans la tige et très légèrement dans les feuilles matures et le bouton floral. Dans les conditions expérimentales testées, aucune accumulation de ce transcrite n'est détectable dans les bourgeons axillaires, qu'ils soient dormants ou en cours de débourrement.

Les transcrits de *RhSUC2* sont quant à eux principalement présents dans les bourgeons en cours de débourrement et la tige. Ils s'accumulent dans les feuilles jeunes, le bourgeon dormant et le bouton floral à un niveau très faible. Aucune amplification n'est détectable dans les autres organes.

Les ARNm de *RhSUC3* et *RhSUC4* sont exprimés dans tous les organes testés (sauf dans la racine pour *RhSUC3*). Le niveau d'expression de *RhSUC3* est à peu près équivalent dans les différents organes, alors que celui de *RhSUC4* est très légèrement inférieur dans le bouton floral.

4.2.3 Niveaux d'ARNm des SUC dans les bourgeons en relation avec le photocontrôle du débourrement

Nous avons étudié la dynamique du taux de transcrite des transporteurs potentiels de saccharose chez le rosier dans le bourgeon après décapitation et exposition des plantes à la lumière ou à l'obscurité pendant 24 à 96 h, par RT-PCR quantitative en temps réel. Les résultats sont présentés en Figure 19. Cette analyse nous a permis de détecter une accumulation des ARNm de *RhSUC2*, *RhSUC3* et *RhSUC4*, mais pas de *RhSUC1* dans le bourgeon axillaire de rosier.

La décapitation, suivie de 24 h d'exposition à la lumière provoque une accumulation (environ 3,5 fois) du transcrite de *RhSUC2* dans le bourgeon. Elle atteint son maximum (environ 4 fois) au bout de 48 h et reste stable jusqu'à 96 h. A l'obscurité, 24 h après la décapitation, on observe également une accumulation du transcrite de *RhSUC2* dans le bourgeon (environ 2,5 fois). Cependant, celui-ci retourne quasiment à son niveau basal dès 48 h. Une comparaison entre les conditions de lumière et d'obscurité indique que l'expression de *RhSUC2* est significativement supérieure à la lumière entre 48 et 96 h après la décapitation.

Dans le bourgeon, les niveaux de transcrite des gènes *RhSUC3* et *RhSUC4* sont inchangés entre 24 et 96 h après la décapitation, à la lumière comme à l'obscurité.

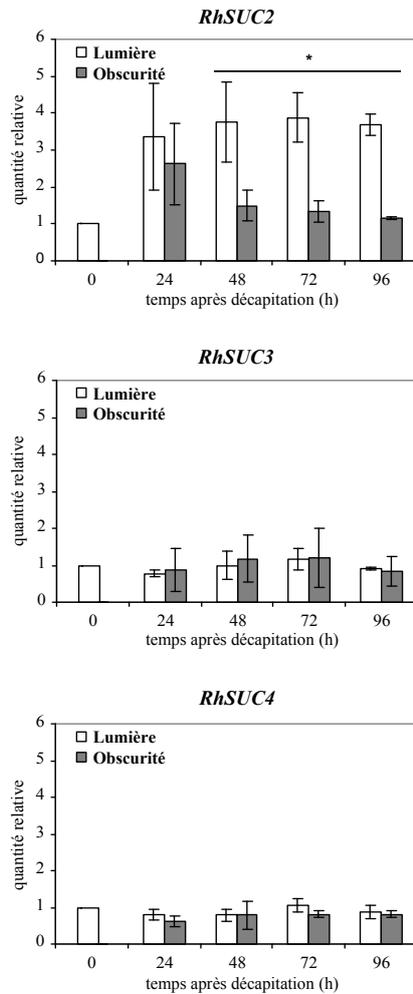


FIGURE 19 – Niveaux relatifs d'ARNm des transporteurs de saccharose (*RhSUCs*) dans les bourgeons axillaires de rosier au cours du temps après décapitation et exposition à la lumière ou l'obscurité. Des plantes au stade BFV sont décapitées, défoliées et placées à la lumière ($70 \pm 10 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ou à l'obscurité pendant 24 à 96 h. Des plantes avant traitement sont utilisées comme témoins de quantification relative. Chaque valeur représente la moyenne \pm l'erreur standard de 3 lots biologiques indépendants. L'étude du niveau relatif d'ARNm a été réalisée par RT-PCR quantitative en temps réel. Le gène *RhSAND1* est utilisé pour normaliser les niveaux d'ARNm. Les astérisques indiquent une différence significative entre les conditions lumière et obscurité pour un temps d'exposition équivalent ($p < 0,05$).

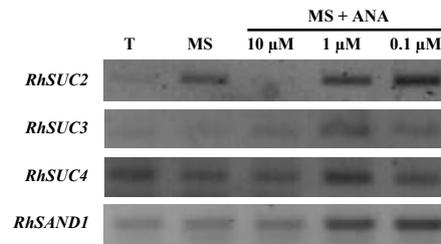


FIGURE 20 – Niveaux relatifs d'ARNm des transporteurs de saccharose (*RhSUC2*, *RhSUC3* et *RhSUC4*) dans les bourgeons axillaires de rosiers cultivés 72 h à la lumière en absence ou présence d'auxine. Les bourgeons sont issus de noeuds cultivés *in vitro* en présence de milieu MS seul ou additionné de 0,1 ; 1 ou 10 μ M d'auxine (ANA), pendant 72 h à la lumière. Des bourgeons dormants issus de plantes au stade BFV sont utilisées comme témoins avant traitement (T). Les ARNs extraits sont amplifiés par RT-PCR semi-quantitative et visualisés par migration en gel d'agarose. Le gène *RhSAND1*, exprimé de manière stable dans le bourgeon est utilisé comme référence.

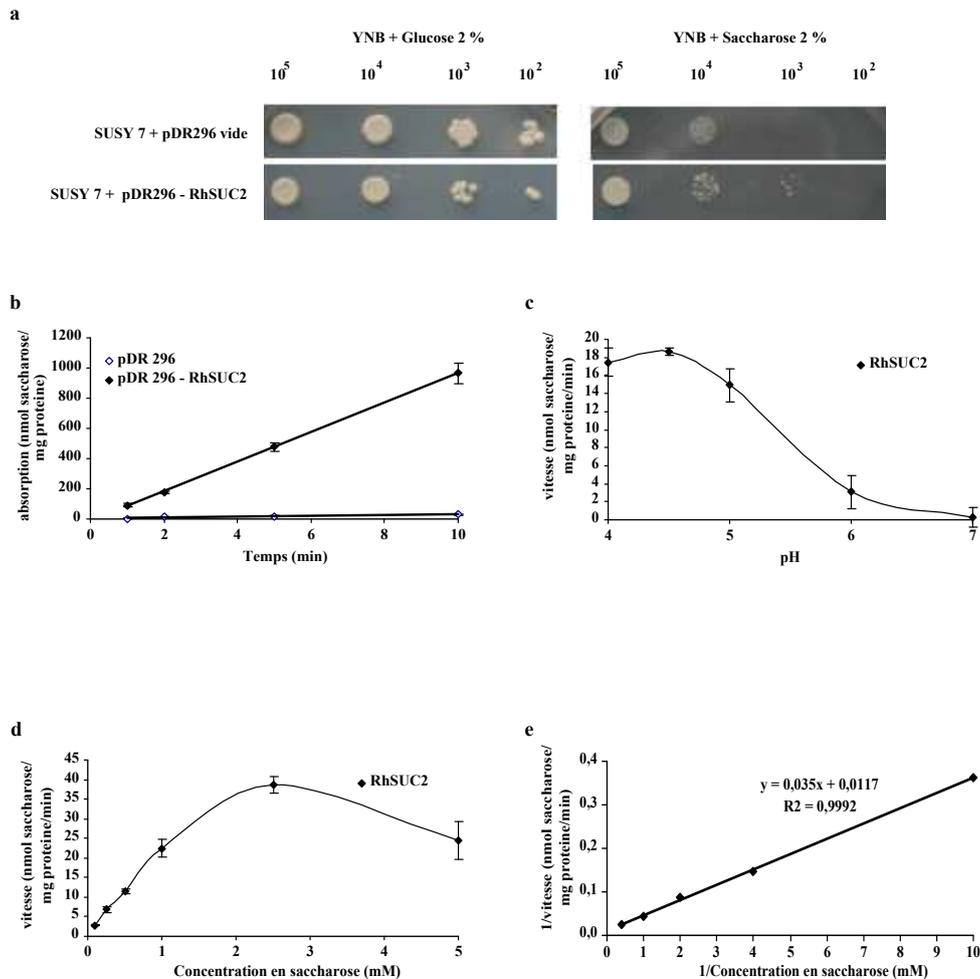


FIGURE 21 – Caractérisation fonctionnelle du transporteur de saccharose RhSUC2 en système hétérologue de levure.

a. Test en goutte. Les souches de levures SUSY7 transformées avec le vecteur pDR296 vide ou le pDR296 ayant intégré RhSUC2 sont cultivées sur milieu YNB contenant 2 % de glucose ou de saccharose comme seule source de carbone et d'énergie. Les souches sont déposées sur le milieu selon une gamme de dilution allant de 10^2 à 10^5 cellules.

b. Cinétique d'absorption du saccharose dans le temps. Les transformants sont incubés 1, 2, 5 et 10 min en présence de 0,5 mM de saccharose radiomarqué dans du MES 25 mM à pH 4.5. Les droites de corrélation permettent de visualiser que l'absorption est stable au cours du temps.

c. Absorption du saccharose en fonction du pH. Les transformants sont incubés 2 min en présence de 2,5 mM de saccharose radiomarqué dans du MES 25 mM dont le pH varie entre 4.5 et 7.

d. Absorption du saccharose en fonction de la concentration. Les transformants sont incubés 2 min en présence de 0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2,5 et 5 mM de saccharose radiomarqué dans du MES 25 mM à pH 4.5.

e. Transformation Lineweaver-Burk des données présentées en d. Pour un pH 4.5 nous obtenons les propriétés cinétiques d'absorption du saccharose suivantes : $K_m = 2,99$ mM et $V_{max} = 21,41$ nmol de saccharose.mg⁻¹ de protéine.min⁻¹.

Pour les sous-figures b à d les valeurs représentées correspondent à la moyenne \pm l'erreur standard. Pour c et d les valeurs d'absorption obtenues pour le pDR296 vide sont retranchées à celles du pDR296-RhSUC2.

4.2.4 Régulation du niveau d'ARNm de *RhSUC2*, *RhSUC3* et *RhSUC4* par l'auxine dans le bourgeon

En culture *in vitro*, un apport exogène d'auxine (ANA à 1 et 10 μM) inhibe le débourrement des bourgeons à la lumière (Sandrine Pelleschi-Travier, communication personnelle). Nous avons donc étudié l'effet de ce dernier sur l'accumulation d'ARNm de *RhSUC2* dans le bourgeon après 72 h d'exposition à la lumière. Des noeuds de rosier ont été cultivés pendant 72 h à la lumière en présence d'un milieu MS seul ou additionné de 0,1 ; 1 ou 10 μM d'auxine (ANA). Des plantes au stade BFV dont les bourgeons sont dormants ont été utilisées comme témoins avant traitement (T). L'analyse du niveau d'ARNm dans les bourgeons a été réalisée par RT-PCR semi-quantitative. Les résultats sont présentés en Figure 20.

Le niveau d'ARNm de *RhSUC2* est quasiment nul dans les bourgeons dormants avant traitement (T). Il est induit chez les bourgeons cultivés 72 h en présence de milieu MS à la lumière. L'ajout de 10 μM d'auxine provoque une inhibition totale de l'accumulation des ARNm de *RhSUC2* dans le bourgeon cultivé 72 h à la lumière. Le niveau d'ARNm de *RhSUC2* dans les bourgeons cultivés 72 h à la lumière en présence de 0,1 ou 1 μM d'auxine est légèrement supérieur par rapport à celui observé dans les bourgeons cultivés en présence de MS seul. Cependant le taux de transcrits de *RhSAND1* est également supérieur dans ces conditions. L'apport exogène d'auxine aux concentrations de 0,1 et 1 μM n'a donc aucun effet sur l'accumulation des transcrits de *RhSUC2* dans le bourgeon après 72 h d'exposition à la lumière. Le taux de transcrits de *RhSUC3* est très faible dans les bourgeons dormants alors que celui de *RhSUC4* est relativement élevé. Cultiver les bourgeons 72 h à la lumière en présence de milieu MS seul ou additionné de 10 ou 1 μM d'auxine n'a aucun effet sur l'expression de ces gènes (lorsqu'on compare leur expression à celle du gène *RhSAND1*). L'ajout de 0,1 μM d'auxine au milieu MS inhibe très légèrement l'expression de ces *RhSUC3* et *RhSUC4* dans le bourgeon cultivé 72 h à la lumière.

4.2.5 Caractérisation fonctionnelle de *RhSUC2* en système hétérologue de levure

Les résultats d'expression génique montrés dans la Figure 19 suggèrent une implication de *RhSUC2* dans le processus de débourrement des bourgeons axillaires de rosier sous le contrôle de la lumière. Afin d'en savoir davantage sur son rôle potentiel dans la physiologie de la plante, nous avons étudié l'activité de co-transport de saccharose/ H^+ de *RhSUC2* en système hétérologue de levure. Pour ce faire, nous avons exprimé sa séquence codante complète dans la souche de levure SUSY7. La souche de levure SUSY7 est mutée pour son invertase pariétale et exprime le gène de la saccharose synthase (Riesmeier et al., 1992). Elle est donc incapable de pousser sur milieu en présence de saccharose comme seule source de carbone. Seule l'expression hétérologue d'un transporteur de saccharose fonctionnel dans sa membrane plasmique restaure cette capacité. Les résultats de la caractérisation fonctionnelle de *RhSUC2* sont présentés en Figure 21.

Dans un premier temps, nous avons réalisé un test en goutte afin de suivre le développement des levures transformées avec le plasmide vide ou contenant *RhSUC2* (Figure 21 a). Nous avons étudié le développement des souches sur un milieu contenant du glucose (témoin positif) ou du saccharose comme seule source de carbone. En présence de glucose, les souches SUSY7 transformées avec le vecteur vide ou contenant *RhSUC2* se développent proportionnellement à la quantité de cellules déposées initialement. Celle transformée avec le vecteur vide croît plus

Tableau 5. Effet de sucres compétiteurs et d'inhibiteurs sur l'absorption de saccharose par RhSUC2 exprimé en système hétérologue de levure (souche SUSY7). L'absorption est réalisée en présence de 2,5 mM de saccharose radiomarqué à pH 4.5. Les astérisques représentent une différence significative entre le témoin et le traité (Test de Student, $p < 0,001$)

Traitement	Pourcentage d'absorption de saccharose
Inhibiteurs	
Témoin	100
CCCP (50 μ M)	25 \pm 2,5 *
PCMBS (100 μ M)	9 \pm 2,0 *
Sucres compétiteurs	
Témoin	100
Saccharose (25 mM)	21 \pm 6,6 *
Glucose (25 mM)	140 \pm 7,2 *
Fructose (25 mM)	157 \pm 4,4 *
Raffinose (25 mM)	103 \pm 3,9
Maltose (25 mM)	43 \pm 2,2 *

rapidement en présence de glucose. Ce résultat indique que la souche transformée avec *RhSUC2* se régénère plus lentement que l'autre. Le développement des souches est fortement réduit en présence de saccharose, surtout celui de la souche SUSY7-pDR296, qui ne pousse que très difficilement lors d'un ensemencement à partir de 10^4 cellules. Pour une dilution plus importante de la souche aucun développement n'est observable. En revanche, la souche exprimant *RhSUC2* présente un meilleur développement, bien que sa capacité de régénération soit plus faible. Elle arrive notamment à pousser pour un dépôt initial de 10^3 cellules.

Les résultats du test en goutte indiquent que les souches transformées avec *RhSUC2* sont capables de se développer sur milieu en présence de saccharose comme seule source de carbone et donc de transporter ce substrat. Les résultats indiquent que *RhSUC2* est un transporteur de saccharose fonctionnel. Nous avons alors procédé à l'analyse de ses caractéristiques cinétiques (Figure 21 b à e).

La Figure 21 b présente les cinétiques d'absorption de saccharose par les souches pDR296 vide et pDR296 - *RhSUC2* au cours du temps. L'incubation est réalisée en présence de 0,5 mM de saccharose radiomarqué à pH 4.5 sur une durée allant de 1 à 10 min. La souche transformée avec le pDR296 vide n'absorbe presque pas de saccharose (un maximum de $30,66 \pm 3,5$ nmol de saccharose.mg⁻¹ de protéine à 10 min) sur la durée totale de l'expérience. En revanche, la souche transformée avec *RhSUC2* absorbe fortement le saccharose (de $91,17 \pm 10,77$ à $966,41 \pm 69,34$ nmol de saccharose.mg⁻¹ de protéine entre 1 et 10 min d'incubation). L'absorption est proportionnelle à la durée d'incubation et linéaire au cours du temps comme l'indique la droite de corrélation entre les points. Dans les conditions testées, aucun phénomène de saturation n'est observé, même après 10 min d'incubation en présence du substrat.

Nous avons ensuite déterminé le pH auquel l'absorption de saccharose par *RhSUC2* est optimale (Figure 21 c). L'incubation est effectuée en présence de 2,5 mM de saccharose dans du tampon MES, selon une gamme de pH allant de 4 à 7. Les valeurs d'absorption obtenues pour le pDR296 vide sont retranchées à celles du pDR296-*RhSUC2* afin de ne considérer que la part active de l'absorption. Elle est importante entre pH 4 et 5 ($14,9 \pm 1,81$ à $18,63 \pm 0,36$ nmol de saccharose.mg⁻¹ de protéine.min⁻¹) avec un optimum à pH 4.5. Puis elle chute de façon drastique à pH 6 ($3,07 \pm 1,85$ nmol de saccharose.mg⁻¹ de protéine.min⁻¹) et devient quasiment nulle à pH 7 ($0,25 \pm 1,06$ nmol de saccharose.mg⁻¹ de protéine.min⁻¹). Ces résultats sont consistants avec un co-transport de saccharose/H⁺.

Les levures ont été incubées en présence de différentes concentrations de saccharose radiomarqué (0,1 à 5 mM) à pH 4.5 pour déterminer la concentration optimale et la vitesse maximale d'absorption du saccharose par *RhSUC2* (Figure 21 d). Comme décrit précédemment, les valeurs d'absorption représentées dans la figure correspondent à l'absorption active (différence entre le pDR296 vide et le pDR296-*RhSUC2*). Le K_m et V_{max} de *RhSUC2* ont été déterminés par transformation des données obtenues selon une représentation de Lineweaver-Burk (Figure 21 e). Son activité de transport est proportionnellement corrélée à la quantité de saccharose présent dans le milieu, et ce jusqu'à ce que la concentration atteigne 2,5 mM (Figure 21 d). L'absorption est alors de $38,76 \pm 2,09$ nmol de saccharose.mg⁻¹ de protéine.min⁻¹. Pour une concentration en saccharose de 5 mM on observe une diminution de l'absorption ($24,48 \pm 4,77$ nmol de saccharose.mg⁻¹ de protéine.min⁻¹). Dans cette expérience, la quantité de saccharose radioactif est fixe alors que celle du saccharose non radioactif est variable. La diminution d'absorption observée à 5 mM pourrait donc être due à un effet compétiteur exercé par le saccharose non marqué en excès dans le milieu. La transformation des données selon la représentation de Lineweaver-Burk a donc été réalisée uniquement à partir des valeurs obtenues entre 0,1 et 2,5 mM (Figure

21 e). Dans la représentation de Lineweaver-Burk où $1/\text{vitesse d'absorption} = f(1/\text{concentration en substrat})$, le point d'intersection de la droite obtenue avec l'axe des abscisses correspond à $(-1/K_m)$ et celui avec l'axe des ordonnées correspond à $(1/V_{max})$. L'équation de la droite de corrélation obtenue est $y = 0,035x + 0,0117$ et son coefficient de corrélation est de 0,9992. Nous avons ainsi pu déterminer une $K_m = 3 \text{ mM}$ et une $V_{max} = 21,41 \text{ nmol de saccharose.mg}^{-1} \text{ de protéine.min}^{-1}$.

Les transporteurs de saccharose précédemment caractérisés sont des co-transporteurs saccharose/ H^+ . Leur activité est fortement inhibée par des protonophores (CCCP et DNP), des inhibiteurs de production d'ATP (antimycine et arsenate) et par des inhibiteurs des groupements thiol (PCMBS et NEM) (Lemoine, 2000; Sauer, 2007). La spécificité des transporteurs de saccharose pour leur substrat est assez forte bien qu'ils puissent également transporter d'autres α - ou β - glucosides comme le maltose (Sauer, 2007). Afin de déterminer les caractéristiques de RhSUC2, nous avons testé l'effet du CCCP et du PCMBS sur son activité. Nous avons également testé l'effet de différents sucres compétiteurs (saccharose, glucose, fructose, raffinose et maltose) afin d'étudier sa spécificité de transport vis à vis du saccharose. Les résultats sont présentés dans le Tableau 5.

En présence de CCCP (50 μM), l'absorption de saccharose par RhSUC2 est fortement réduite (d'environ 75%) par rapport à celle du témoin. Elle est également fortement réduite (91%) par le PCMBS (100 μM).

Dans les expériences de compétition, le saccharose et le maltose non radioactifs fournis en excès ont un effet inhibiteur sur l'activité de transport de saccharose de RhSUC2 (79 et 57 % d'inhibition respectivement). L'activité de RhSUC2 est en revanche stimulée par un apport en excès de glucose ou de fructose non radioactifs (140 et 157 % d'activité respectivement). L'ajout de raffinose non radioactif en excès n'a quant à lui aucun effet significatif sur l'activité de RhSUC2.

4.2.6 Conclusions

Une recherche dans les bases de données nous a permis d'identifier une séquence ADNc partielle codant potentiellement pour un transporteur de saccharose chez le rosier : *RhSUC3*. Nous avons isolé 3 nouvelles séquences de transporteurs de saccharose : 2 partielles (*RhSUC1* et *RhSUC4*) et une complète (*RhSUC2*).

Parmi les 4 transporteurs de saccharose potentiels disponibles, les ARNm de trois d'entre eux sont présents dans le bourgeon : *RhSUC2*, *RhSUC3* et *RhSUC4*. Et l'un d'entre eux, *RhSUC2*, est plus fortement exprimé dans les bourgeons en cours de débourrement que dans les bourgeons dormants.

L'analyse du taux de transcrite de ces 3 transporteurs dans les bourgeons exposés à la lumière ou à l'obscurité, entre 24 et 96 h après la décapitation, révèle que seul *RhSUC2* présente un profil d'expression corrélé au débourrement des bourgeons. En effet son expression est induite à la lumière alors qu'elle reste stable à l'obscurité entre 48 et 96 h. Le traitement n'a aucun effet sur l'expression de *RhSUC3* et *RhSUC4*.

L'apport exogène de 10 μM d'auxine (concentration inhibitrice du débourrement) inhibe totalement l'accumulation des ARNm de *RhSUC2* dans le bourgeon au bout de 72 h d'exposition à la lumière.

La caractérisation fonctionnelle de *RhSUC2* en système hétérologue de levure révèle qu'il s'agit d'un co-transporteur de saccharose/ H^+ à forte affinité ($K_m = 3 \text{ mM}$). Une analyse de compétition indique que le maltose inhibe l'activité d'absorption du saccharose de *RhSUC2*, alors que le glucose et le fructose la stimulent.

4.3 Implication des transporteurs de monosaccharides (MST) dans le photocontrôle du débourrement

Les résultats d'accumulation de sucres radiomarqués dans les bourgeons décrits en page 45 indiquent que les hexoses pourraient jouer un rôle plus important que le saccharose lors des étapes précoces de la régulation du débourrement par la lumière.

Les hexoses sont importés de manière plus précoce que le saccharose dans les bourgeons exposés à la lumière par rapport à l'obscurité. L'importation de ces sucres fait intervenir une composante active. Ces résultats suggèrent l'implication de transporteurs d'hexoses dans le photocontrôle du débourrement. Nous avons donc cherché à identifier quels sont les transporteurs impliqués dans ce processus.

4.3.1 Isolement des séquences et analyses phylogénétiques

Une recherche dans les bases de données GDR (Genome Database for Rosaceae) et URGI (Unité de Recherche Génomique Info) nous a permis d'identifier les séquences ADNc partielles codant potentiellement pour trois transporteurs de monosaccharides chez le rosier :

- *RoTMT2* (CL_RO_3853.1-W_W3_B21_01, 408 pb)
- *RoSGB1* (CL_RO_2841.1-12076074, 498 pb)
- *RopGlcT* (CL_RO_4560.1-19612707, 639 pb)

Comme pour les transporteurs de saccharose précédemment décrits, nous leur avons attribué un nom dérivé de leur homologue le plus proche chez l'arabette.

Les transporteurs d'hexoses plasmalemmiques appartenant à la sous-famille des STP sont responsables de l'influx d'hexoses dans les cellules. Ils pourraient donc jouer un rôle primordial dans l'importation des sucres par les cellules puits du bourgeon au cours du débourrement.

Nous avons procédé à l'isolement de séquences d'ADNc partielles des STP de rosiers. Les clonages ont été réalisés de la même façon que pour les transporteurs de saccharose. Nous avons ainsi identifié 7 nouvelles séquences codant potentiellement pour 5 transporteurs de d'hexoses plasmalemmiques :

- *RhSTP1* (443 pb)
- *RhSTP5* (350 pb)
- *RhSTP7* (401 pb)
- *RhSTP9* (355 pb)

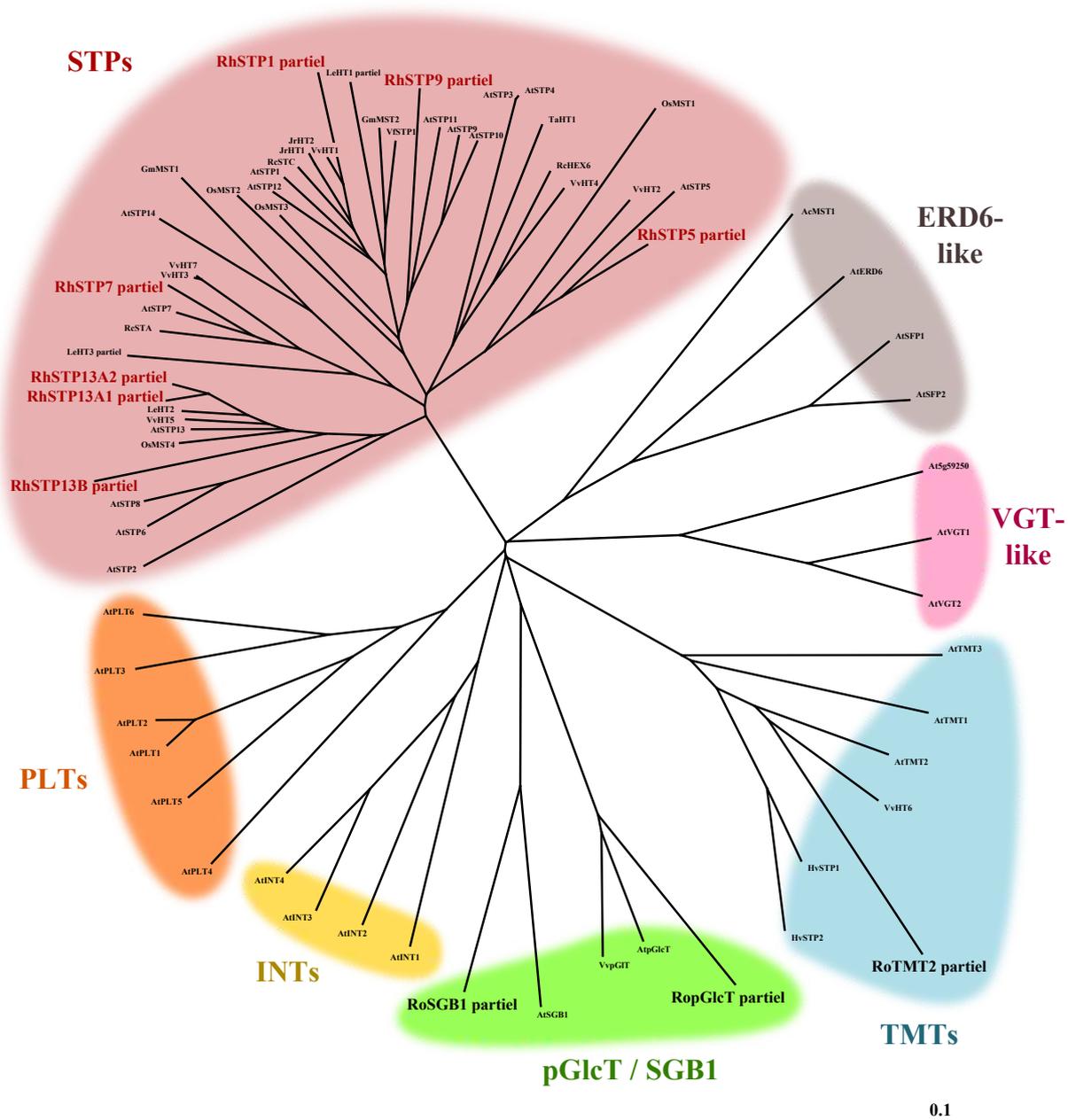


FIGURE 22 – Arbre phylogénétique des transporteurs de monosaccharides, de polyols et d’inositol (MST-like) de plantes. Les séquences protéiques prédites partielles des transporteurs de monosaccharides de *Rosa sp.* et *Rosa hybrida* ont été comparées aux séquences complètes confirmées ou prédites de transporteurs (MST-like) chez différentes plantes. L’arbre phylogénétique a été construit et visualisé à l’aide des logiciels ClustalW et Treeview. Les sous familles définies chez l’arabette par Büttner (2007) sont indiquées. Les numéros d’accèsion des différents transporteurs utilisés pour construire l’arbre sont indiqués en Annexe O. Les barres indiquent les distances phylogénétiques.

- *RhSTP13A1* (407 pb)
- *RhSTP13A2* (407 pb)
- *RhSTP13B* (410 pb)

Ces transporteurs appartiennent à la famille multigénique des MST-like composée de 7 sous familles dont celle des STP. Au sein d'une même sous famille les séquences protéiques partagent entre 42 et 96 % d'identité. Les séquences protéiques sont cependant peu conservées entre les différentes sous familles (Büttner, 2007).

Nous avons pour notre part regroupé les membres appartenant aux mêmes groupes phylogénétiques afin de réaliser des alignements des séquences nucléiques partielles des transporteurs de monosaccharides que nous avons isolé chez le rosier avec celles de leurs potentiels homologues chez l'arabette (Annexe P).

La séquence ADNc partielle de *RoTMT2* s'aligne à 68 % avec la séquence codante d'*AtTMT2*, son homologue le plus proche chez l'arabette.

Les séquences ADNc partielles de *RoSGB1* et *RopGlcT* se chevauchent et s'alignent dans les régions codantes de leurs homologues chez l'arabette. Elles présentent respectivement 60 et 56 % d'homologie avec les séquences ADNc complètes d'*AtSGB1* et *AtpGlcT*.

Les séquences ADNc partielles de *RhSTP5*, *RhSTP7*, *RhSTP13A1*, *RhSTP13A2* et *RhSTP13B* se chevauchent et s'alignent avec le début de la région codante de leurs homologues chez l'arabette. *RhSTP5* et *RhSTP7* présentent respectivement 67 et 72 % d'homologies avec celles d'*AtSTP5* et *AtSTP7*. *RhSTP13A1*, *RhSTP13A2* et *RhSTP13B* sont quant à elles homologues à *AtSTP13* (69, 69 et 59 % respectivement). Les séquences de *RhSTP13A1* et *RhSTP13A2* sont très proches (95 % d'homologie). Ces EST correspondent donc certainement au même gène, bien que nous n'ayons pas pu obtenir de séquence consensus. En revanche, *RhSTP13B* présente une séquence relativement différente de celles de *RhSTP13A1* et *RhSTP13A2* (73 % d'homologie et une insertion de 3 pb). *RhSTP13B* pourrait donc correspondre à une isoforme différente du gène *STP13*. La séquence ADNc partielle de *RhSTP1* ne s'aligne quasiment pas avec les séquences des autres *RhSTPs* et s'aligne à 70 % avec la partie centrale de la région codante d'*ATSTP1*. La séquence de *RhSTP9* présente quant à elle 60 % d'homologie avec la fin de la région codante d'*AtSTP9*.

Les transporteurs de monosaccharides sont impliqués dans divers processus physiologiques et présentent des caractéristiques cinétiques et des localisations cellulaires et tissulaires variables (Büttner, 2007). A partir des données disponibles (parfois très partielles), nous avons procédé à une analyse phylogénétique des séquences protéiques partielles prédites des transporteurs de saccharose de rosier afin d'avoir une idée de leurs caractéristiques et de leur rôle potentiel dans la physiologie du rosier. Nous avons notamment fait le choix d'utiliser les séquences d'espèces modèles de Mono- et de Dicotylédones (riz, arabette et tomate), de plantes ligneuses (vigne et noyer) et/ou de transporteurs exprimés dans des organes puits (graine, fruit ou racine). Les résultats de l'analyse phylogénétique sont présentés en Figure 22.

Parmi les transporteurs identifiés dans les banques de données, *RoSGB1* et *RopGlcT* appartiennent à la sous famille des pGlcT/SGB1. *RoSGB1* a pour homologue le plus proche *AtSGB1* (63 % d'identité) (Wang et al., 2006), un transporteur d'hexoses localisé dans l'appareil de Golgi. *RopGlcT* partage 70 et 68 % d'identité avec *VvpGlcT* (Vignault et al., 2005) et *AtpGlcT* respectivement. L'homologue d'*AtpGlcT* chez l'épinard est un transporteur de glucose potent-

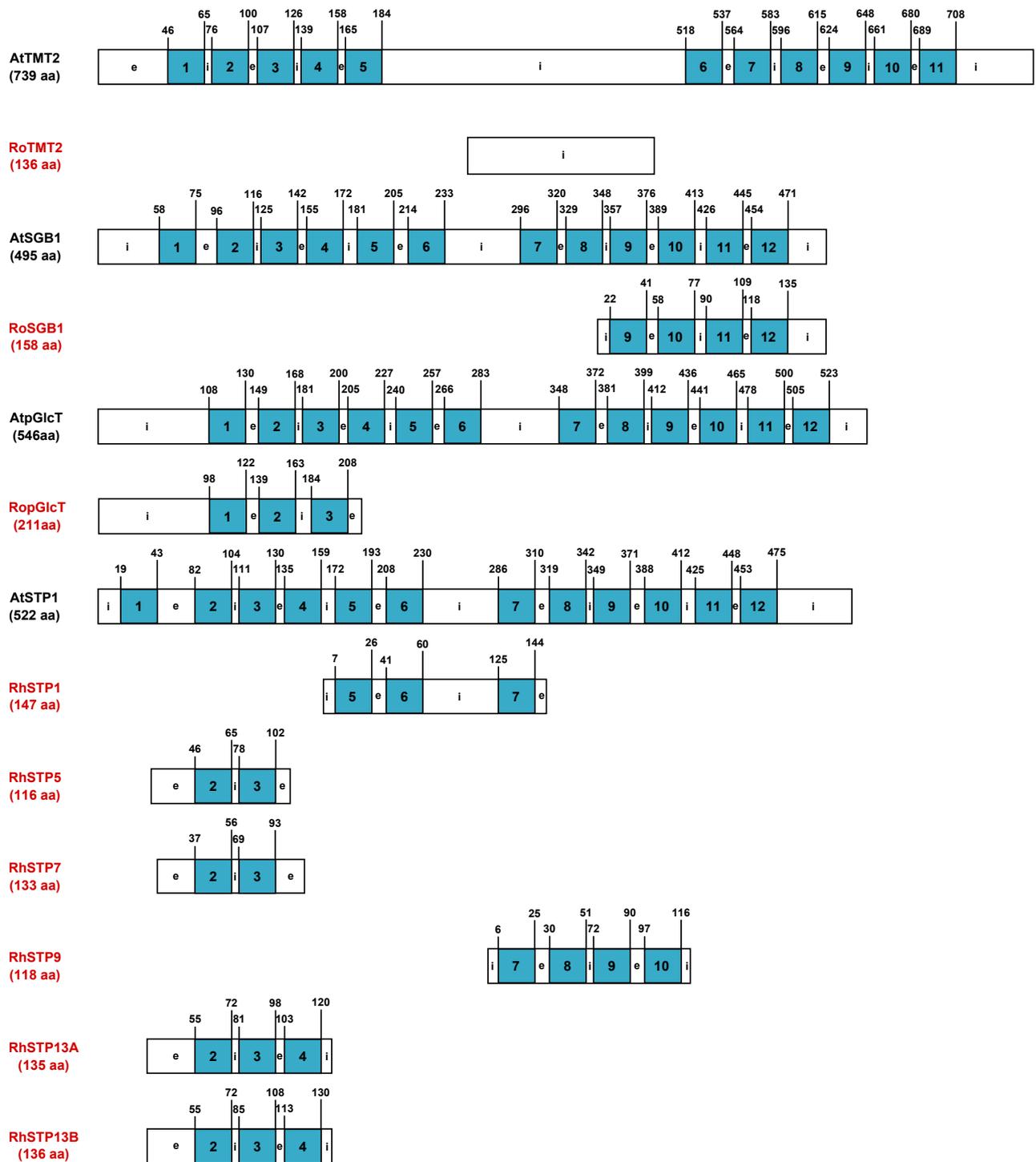


FIGURE 23 – Topologie des séquences protéiques partielles des MSTs isolés chez le rosier et positionnement par rapport à la séquence complète de leurs homologues chez l'arabette. Les séquences protéiques partielles des différents MSTs isolés chez le rosier ont été alignées avec celles de certains de leurs homologues chez l'arabette : AtTMT2 (NP_849565), AtSGB1 (NP_178100), AtpGlcT (NP_568328) et AtSTP1 (AAL24129). Les alignements et la prédiction de la topologie des séquences protéiques ont été réalisés à l'aide des logiciels ClustalW et HMMTOP. Le nom et la taille de chaque séquence protéique sont indiqués à gauche de la séquence. Les noms des MSTs isolés chez le rosier figurent en rouge. Les domaines intracellulaires (i) et extracellulaires (e) sont représentés en blanc. Les domaines transmembranaires sont numérotés et représentés en bleu. Les positions initiales et terminales des domaines transmembranaires sont indiqués au dessus des séquences.

iel localisé dans la membrane interne des chloroplastes (Weber et al., 2000).

RoTMT2 fait quant à lui partie de la sous famille des TMTs, qui seraient des transporteurs d'hexoses tonoplastiques (Endler et al., 2006; Wormit et al., 2006). Son homologue le plus proche est AtTMT2 (65 % d'identité) (Wormit et al., 2006).

Les transporteurs de monosaccharides que nous avons cloné appartiennent tous à la sous famille des STPs. Chez l'arabette, elle rassemble des transporteurs d'hexoses à forte affinité de la membrane plasmique. Ces transporteurs catalysent l'influx de sucres dans les cellules (Büttner, 2007).

RhSTP1 est homologue à VvHT1 (Fillion et al., 1999), RcSTC (Weig et al., 1994), AtSTP1 (Sauer et al., 1990) et VfSTP1 (Weber et al., 1997) (87, 84, 84 et 82 % d'identité respectivement).

RhSTP5 a pour homologues VvHT2 (Vignault et al., 2005) et AtSTP5 (80 et 78% d'identité respectivement).

RhSTP7 présente la plus forte identité avec AtSTP7 dont les propriétés et la fonction ne sont pas encore connus (84 %). RhSTP7 est également proche de RcSTA (Weig et al., 1994) et VvHT3 (Hayes et al., 2007) (81 et 78 % respectivement).

RhSTP9 partage 69 % d'identité avec AtSTP9, son plus proche homologue (Schneidereit et al., 2003).

RhSTP13A1 et RhSTP13A2 présentent 85 à 87 % d'identité avec LeHT2 (Gear et al., 2000) et VvHT5 (Hayes et al., 2007) et 83 et 84 % avec AtSTP13. RhSTP13B partage quant à lui 69 % d'identité avec VvHT5 et 66 % avec AtSTP13 (Norholm et al., 2006).

La topologie et la position des séquences protéiques partielles des transporteurs de monosaccharides par rapport à leurs homologues chez l'arabette sont présentés en Figure 23. D'une manière générale les MSTs présentent 12 domaines transmembranaires, des extrémités N- et C-terminales et une boucle cytoplasmique centrale (entre les domaines transmembranaires 6 et 7).

Les AtTMTs se différencient des autres MST par une délétion de l'extrémité N-terminale (domaine intracellulaire + premier domaine transmembranaire) et une extension de la boucle cytoplasmique centrale. RoTMT2 correspond à une partie de la grande boucle cytoplasmique centrale d'AtTMT2. RoSGB1 s'aligne avec la partie C-terminale d'AtSGB1. Il présente 4 domaines transmembranaires correspondant aux domaines 9 à 12 d'AtSGB1. RopGlcT correspond à la partie N-terminale d'AtpGlcT. Sa séquence protéique s'étend jusqu'au 4^{ème} domaine transmembranaire d'AtpGlcT mais ne présente que 3 domaines transmembranaires prédits.

Chez l'arabette, la topologie des différents STPs est fortement conservée (à l'exception de celle d'AtSTP2). De même, leur taille totale varie peu (entre 504 et 526 acides aminés). Pour cette sous famille nous avons donc uniquement représenté la topologie d'AtSTP1. RhSTP1 correspond à la partie centrale d'AtSTP1, comprise entre les domaines transmembranaires 4 et 8. Il présente 3 domaines transmembranaires correspondant aux domaines 5 à 7 chez AtSTP1. RhSTP5, RhSTP7, RhSTP13A(1 et 2) et RhSTP13B s'alignent avec une partie de l'extrémité N-terminale d'AtSTP1. RhSTP5 et RhSTP7 présentent 2 domaines transmembranaires correspon-

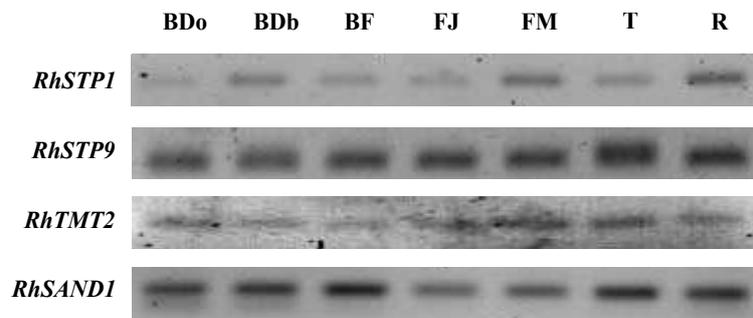


FIGURE 24 – Niveaux d'ARNm des transporteurs de monosaccharides (*RhSTP1*, *RhSTP9* et *RhTMT2*) dans les différents organes de rosier. Les ARNs extraits des différents organes de rosier : bourgeon dormant (BDo) ou en cours de débourrement (BDb), bouton floral (BF), feuille jeune (FJ) ou mature (FM), tige (T) et racine (R) sont amplifiés par RT-PCR semi-quantitative et visualisés par migration en gel d'agarose. Le gène *RhSAND1*, stablement exprimé dans les différents organes, est utilisé comme référence.

ondant aux domaines 2 et 3 d'AtSTP1. RhSTP13A(1 et 2) et RhSTP13B présentent 3 domaines transmembranaires similaires aux domaines 2 à 4 d'AtSTP1. RhSTP9 s'aligne à la seconde moitié d'AtSTP1. Il présente 4 domaines transmembranaires correspondant aux domaines 7 à 10 d'AtSTP1.

Les séquences de transporteurs d'hexoses isolées précédemment ont été utilisées pour définir des couples d'amorces spécifiques de chaque gène. Cependant, nous n'avons pu en obtenir que pour *RhSTP1*, *RhSTP9* et *RhTMT2*. En conséquence les résultats présentés par la suite ne concernent que ces gènes.

4.3.2 Niveau d'ARNm des MST dans les différents organes

La spécificité d'expression des gènes *RhMSTs* dans les différents organes du rosier par RT-PCR semi-quantitative est présentée dans la Figure 24.

L'expression du gène de référence *RhSAND1* est assez stable dans les différents organes étudiés, hormis dans les feuilles jeunes et matures où elle est un peu plus faible que dans les autres organes.

Le transcrite de *RhSTP1* est détectable dans tous les organes testés, mais de façon plus importante dans les racines, le bourgeon en cours de débourrement et les feuilles matures.

RhSTP9 est également exprimé dans tous les organes mais de manière un peu plus importante dans les tiges.

L'ARNm de *RhTMT2* s'accumule lui aussi dans tous les organes mais son niveau d'expression est très faible dans les conditions testées.

4.3.3 Niveaux d'ARNm des MST dans les bourgeons en relation avec le photocontrôle du débourrement

Nous avons donc étudié l'évolution au cours du temps du niveau d'ARNm de *RhTMT2*, *RhSTP1* et *RhSTP9* dans le bourgeon après décapitation et exposition des plantes à la lumière ou à l'obscurité pendant 24 à 96 h. La quantification du niveau relatif de transcrite des gènes a été réalisée par RT-PCR quantitative en temps réel. Les résultats sont présentés en Figure 25.

A la lumière, 24 h après la décapitation, le transcrite de *RhSTP1* s'accumule fortement (5,8 fois) dans le bourgeon. Son taux de transcrite diminue ensuite progressivement entre 48 et 96 h pour retourner quasiment à son état basal. En effet, au bout de 96 h l'expression présente une stimulation de seulement 1,6 fois. A l'obscurité, le niveau d'ARNm de *RhSTP1* est également induit après la décapitation. L'induction est alors plus importante et plus durable qu'à la lumière. Bien que la tendance soit la même entre les différents lots biologiques on observe une grande variabilité de l'amplitude de la réponse entre ceux-ci, phénomène à l'origine de l'amplitude des erreurs standards observée (principalement entre 48 et 96 h). Ainsi, 24 h après la décapitation,

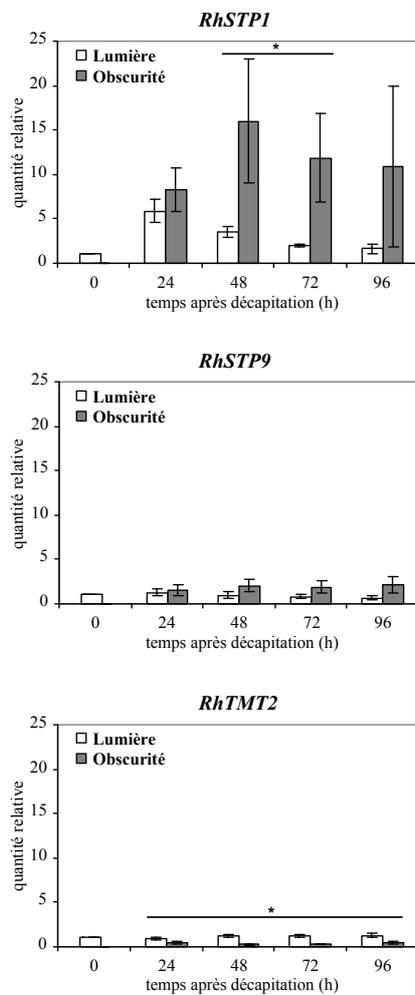


FIGURE 25 – Niveau relatif d'ARNm des transporteurs de monosaccharides (*RhSTP1*, *RhSTP9* et *RhTMT2*) dans les bourgeons axillaires de rosier au cours du temps après décapitation et exposition à la lumière ou l'obscurité. Des plantes au stade BFV sont décapitées, défoliées et placées à la lumière ($70 \pm 10 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ou à l'obscurité pendant 24 à 96 h. Des plantes avant traitement sont utilisées comme témoins de quantification relative. Chaque valeur représente la moyenne \pm l'erreur standard de 3 lots biologiques indépendants. L'étude du niveau relatif d'ARNm a été réalisée par RT-PCR quantitative en temps réel. Le gène *RhSAND1* est utilisé pour normaliser les niveaux de transcrits. Les astérisques indiquent une différence significative entre les conditions lumière et obscurité pour un temps d'exposition équivalent ($p < 0,05$).

l'induction du taux de transcrit est de 8,3 fois. L'accumulation de *RhSTP1* atteint son maximum à 48 h (16 fois) et reste élevée entre 72 et 96 h (11 à 12 fois). Une comparaison entre les deux conditions lumineuses indique que l'expression de *RhSTP1* est significativement supérieure à l'obscurité par rapport à la lumière entre 48 et 72 h après la décapitation.

Dans le bourgeon, les taux de transcrits de *RhSTP9* est reste stable et à son niveau basal entre 24 et 96 h après la décapitation, à la lumière comme à l'obscurité.

Le taux de transcrit de *RhTMT2* reste stable à la lumière après la décapitation, alors qu'il diminue à l'obscurité. L'inhibition de l'expression de *RhTMT2* est progressive et transitoire. Elle atteint son maximum entre 48 et 72 h (3,6 à 3,7 fois).

4.3.4 Conclusions

Une recherche dans les bases de données nous a permis d'identifier trois séquences ADNc partielles codant potentiellement pour des transporteurs de monosaccharides chez le rosier : *RoTMT2*, *RoSGB1* et *RopGlcT*. Nous avons isolé 7 nouvelles séquences partielles codant potentiellement pour 6 transporteurs d'hexoses plasmalemmiques : *RhSTP1*, *RhSTP5*, *RhSTP7*, *RhSTP9*, *RhSTP13A* et *RhSTP13B*. Pour des raisons techniques (faisabilité d'amorces suffisamment spécifiques), seule l'expression des gènes *RhTMT2*, *RhSTP1* et *RhSTP9* a pu être étudiée.

RhSTP1, *RhSTP9* et *RhTMT2* sont tous exprimés dans les bourgeons au niveau transcriptionnel. Cependant, seul *RhSTP1* présente une accumulation de son transcrit plus importante dans les bourgeons en cours de débourrement que dans les bourgeons dormants.

En réponse à la présence ou l'absence de lumière, seul le taux de transcrit de *RhSTP1* et *RhTMT2* varie dans le bourgeon à la suite de la décapitation. L'expression de *RhSTP1* est fortement induite à la lumière dès 24 h puis décline progressivement. Cependant, à l'obscurité, son expression est induite de façon encore plus importante avec un maximum entre 48 et 72 h. En raison d'une forte variabilité d'amplitude des lots biologiques, la différence d'expression de ce gène n'est significative qu'entre 48 et 72 h. Le taux de transcrit de *RhTMT2* est quant à lui stable à la lumière et diminue transitoirement à l'obscurité entre 24 et 96 h après la décapitation.

Chapitre 5

Discussion

Le débourrement est un processus fondamental conditionnant l'établissement de l'architecture d'une plante. Il correspond à la reprise de croissance des bourgeons, après que les phénomènes de dormance auxquels ces derniers sont soumis aient été supprimés. Il est finement régulé et fait intervenir des processus d'organogénèse et d'allongement. Divers travaux indiquent que les sucres joueraient un rôle primordial dans la régulation de ces processus. Ils régulent notamment les divisions et l'expansion cellulaire, ainsi que le développement et l'activité du méristème caulinaire. Le débourrement s'accompagne généralement de modifications des quantités de sucres et de l'activité métabolique dans le bourgeon et/ou la portion de tige adjacente ainsi que d'une induction de l'activité puits du bourgeon vis à vis des sucres. Ces données indiquent que le bourgeon aurait besoin d'importer les sucres nécessaires à son débourrement. L'importation et le transport des sucres dans le bourgeon impliqueraient des voies de déchargement du phloème probablement différentes selon le stade de développement et/ou l'espèce considérée. Le déchargement et le transport des sucres par voie apoplasmique nécessitent la présence de transporteurs de sucres (saccharose ou monosaccharides), dont l'expression et le rôle physiologique n'a pas encore été étudié dans le bourgeon végétatif.

Chez le rosier, la lumière est indispensable au débourrement (Khayat et Zieslin, 1982; Girault et al., 2008). Cette régulation implique une mobilisation des réserves de la tige et des modifications du métabolisme glucidique dans le bourgeon : une augmentation de l'activité de l'invertase vacuolaire et une accumulation de saccharose et de glucose (Girault et al., 2010). Dans ce contexte scientifique, ce travail de thèse avait pour objectif d'apporter des éléments de connaissances sur les points suivants :

1. Les besoins en sucres des bourgeons lors du photocontrôle du débourrement.
2. Les mécanismes d'approvisionnement en sucre du bourgeon.
3. Le rôle potentiel des transporteurs de sucres (saccharose et monosaccharides) dans le photocontrôle du débourrement.
4. Les mécanismes potentiellement impliqués dans la régulation des transporteurs d'intérêt.

Les résultats obtenus sont discutés ci-après et un schéma récapitulatif illustrant le rôle des sucres dans la régulation du débourrement par la lumière est proposé en conclusion.

5.1 La lumière, nécessaire au débourrement, régule l'activité puits du bourgeon

A la lumière, dès 6 jours, la décapitation induit fortement le débourrement en stimulant l'organogénèse et l'allongement des bourgeons. En système *in vitro*, après 6 jours de culture, le débourrement des bourgeons à la lumière requiert un apport exogène de sucres métabolisables. Des expériences menées sur 12 jours montrent que le débourrement n'est pas totalement inhibé mais fortement retardé lorsqu'aucun sucre exogène n'est apporté au bourgeon. Deux hypothèses pourraient expliquer ce phénomène :

1. **Le bourgeon serait capable de mobiliser des réserves glucidiques endogènes ou provenant de la tige.** Les réserves glucidiques du rosier sont plus importantes dans les tiges que dans les bourgeons dormants. Les tiges de rosier accumulent principalement du saccharose et du glucose, ainsi que de l'amidon en quantité beaucoup plus faible. Les bourgeons dormants contiennent essentiellement du saccharose. Chez les plantes décapitées, le débourrement des bourgeons à la lumière s'accompagne d'une diminution temporaire des teneurs en saccharose et en glucose dans la tige entre 24 et 48 h après la décapitation. Parallèlement, on observe une diminution puis une augmentation de la quantité de saccharose et d'une augmentation de la quantité de glucose dans le bourgeon (Girault et al., 2010). Nos expériences ont permis de mettre en évidence une diminution de la quantité de sucres solubles dans les bourgeons cultivés 3 jours en absence de sucres par rapport à ceux cultivés en présence de sucres métabolisables. Ceci indique que dans ces conditions, le bourgeon utilise ses propres réserves et a besoin d'importer des sucres en provenance de la tige pour pouvoir débourrer. L'ensemble de ces résultats appuie l'hypothèse d'une mobilisation des sucres solubles de la tige et du bourgeon de rosier lors du débourrement.
2. **La portion de tige adjacente au bourgeon serait capable de synthétiser les sucres utilisés pour le débourrement en effectuant la photosynthèse.** Les tiges des rosiers utilisés pour nos expériences sont chlorophylliennes. Certaines espèces herbacées (tomate) et ligneuses (genêt d'Espagne) possèdent une tige chlorophyllienne capable de réaliser la photosynthèse (Nilsen, 1992; Hibberd et Quick, 2002). Cette hypothèse est en accord avec de récents résultats obtenus au laboratoire, montrant que le débourrement est totalement inhibé en absence d'un apport exogène de sucres lorsque la tige est protégée de la lumière par un papier opaque (Amélie Rabot, communication personnelle). Alors même qu'en système de plante entière décapitée, l'éclairement du bourgeon seul suffit à déclencher son débourrement (Girault et al., 2008).

L'apport de sucres métabolisables (saccharose, glucose ou fructose) stimule fortement le débourrement avec un effet optimal à 250 mM. Ces sucres induisent à la fois l'organogénèse et l'allongement. En revanche, l'apport exogène de sucre non métabolisable (mannitol) inhibe totalement l'organogénèse et l'allongement des bourgeons, quelle que soit la concentration testée. Ces résultats suggèrent que le rôle osmotique des sucres ne serait pas suffisant pour déclencher le débourrement, ces derniers auraient un rôle trophique ou signal et agiraient à la fois sur les processus d'organogénèse et d'allongement.

Le sorbitol permet un débourrement réduit à 100 mM uniquement. Bien que ce sucre soit transporté chez de nombreuses Rosacées, ce n'est vraisemblablement pas le cas chez le rosier (Zimmermann et Ziegler, 1975). On ne détecte ce sucre ni dans les tiges, ni dans les bourgeons axillaires de cette espèce. Cependant, la sorbitol deshydrogénase-NAD dépendante (NAD-SDH), enzyme catalysant la conversion réversible du sorbitol en fructose, est active dans

le bourgeon (Girault et al., 2010). *In vitro*, le sorbitol fourni en faible concentration au bourgeon pourrait être métabolisé par l'activité de la NAD-SDH et servir au débourrement. L'inhibition du débourrement observée lorsque le sorbitol est fourni en forte concentration au bourgeon pourrait être dû à un stress osmotique, causé par l'accumulation de ce sucre dans le compartiment apoplasmique. *In planta*, le sorbitol jouerait un rôle mineur dans l'approvisionnement en sucres du bourgeon lors du débourrement.

L'ensemble de nos résultats confirment que **le bourgeon de rosier est un organe puits qui nécessite d'importer des sucres métabolisables comme le saccharose, le glucose et le fructose pour débourrer à la lumière**. Cette hypothèse est en accord avec les résultats obtenus chez les bourgeons de palmier dattier, qui nécessitent également un apport exogène de sucres métabolisables pour se développer *in vitro* (Al-Khateeb, 2008).

La décapitation et l'exposition des plantes à la lumière pendant 72 et 96 h engendre une augmentation de l'accumulation des sucres radiomarqués (glucose, fructose et saccharose) dans le bourgeon. L'exposition des plantes à l'obscurité, condition inhibant le débourrement, entraîne une légère augmentation de l'accumulation de saccharose et de glucose radiomarqués mais pas de celle du fructose. L'accumulation de ces sucres dans le bourgeon après la décapitation est cependant plus importante à la lumière qu'à l'obscurité (dès 72 h pour les hexoses et à 96 h pour le saccharose). La différence d'accumulation des sucres radiomarqués entre les bourgeons exposés à la lumière ou à l'obscurité est plus importante et précoce pour les hexoses que pour le saccharose. Nous avons également montré que la capacité d'absorption des sucres (saccharose et glucose) par les bourgeons fait intervenir à la fois une part passive et active de transport. La part passive de transport pourrait être assurée par les connexions symplasmiques présentes dans les tissus adjacents au faisceau conducteur pénétrant dans le bourgeon. On remarque notamment que la vascularisation du bourgeon se développe en même temps que l'ébauche de tige qu'elle contient. De plus, on commence à observer une vascularisation des écailles et des primordia les plus âgés à partir de 72 h après la décapitation. Cependant, le méristème n'est vraisemblablement pas connecté aux tissus adjacents par des plasmodesmes.

Pris dans leur ensemble ces résultats suggèrent que : **(i) la décapitation provoque une augmentation de la force puits des bourgeons vis à vis des sucres, (ii) les hexoses sont plus précocement et préférentiellement absorbés par les bourgeons exposés à la lumière que le saccharose, ils joueraient donc un rôle prépondérant dans l'établissement de la force puits du bourgeon et sa régulation par la lumière lors des étapes précoces du débourrement (les 72 premières heures après la décapitation, soit 24 h avant que les bourgeons n'aient débourré), (iii) l'importation des sucres par les bourgeons nécessite : (a) une part passive de transport, assurée par des connexions symplasmiques entre les faisceaux conducteurs du phloème pénétrant dans le bourgeon et les tissus adjacents et (b) une part active, assurée par des transporteurs de saccharose et/ou d'hexoses**. Nos résultats sont en accord avec les travaux réalisés chez le bourgeon végétatif de pêcher, où les hexoses jouent un rôle prépondérant lors des étapes précoces du débourrement (Maurel et al., 2004).

5.2 Rôle des transporteurs de saccharose dans le photocontrôle du débourrement

Chez le rosier, le débourrement est régulé par la lumière (Girault et al., 2008). Cette régulation s'accompagne notamment d'une augmentation de la quantité de saccharose dans le bourg-

on (Girault et al., 2010), qui pourrait être due à une modification de la force puits de ce dernier et impliquerait l'activité de transporteurs de saccharose. Sachant le rôle important de ces transporteurs dans l'importation et le transport du saccharose dans divers tissus puits, nous avons voulu comprendre leur implication dans le processus physiologique étudié.

5.2.1 Transporteurs de saccharose exprimés dans le bourgeon végétatif de rosier

Quatre isoformes de transporteurs potentiels de saccharose ont pu être identifiées chez le rosier (*RhSUC1*, *RhSUC2*, *RhSUC3* et *RhSUC4*), soulignant leur appartenance à une famille multigénique, comme c'est le cas chez diverses espèces herbacées (arabette, tomate, tabac, riz...) et ligneuses (vigne, hévéa...). Les transporteurs potentiels de saccharose isolés chez le rosier présentent une forte identité de séquence avec les transporteurs de saccharose isolés chez des Di- ou Monocotylédones, et plus particulièrement avec ceux du pommier (77 % pour *RhSUC4*) et de l'hévéa (de 66 à 77 % d'identité en fonction de l'isoforme considérée). D'autre part, ces transporteurs sont répartis dans les trois sous groupes phylogéniques qui rassemblent l'ensemble des transporteurs isolés chez les Dicotylédones selon la classification définie par Sauer (2007), *RhSUC1* et *RhSUC2* appartiennent au groupe 2, *RhSUC3* appartient au groupe 3 et *RhSUC4* au groupe 4. Les ARNm de trois d'entre eux : *RhSUC2*, *RhSUC3* et *RhSUC4* sont présents dans le bourgeon.

Le groupe phylogénique auquel appartiennent *RhSUC1* et *RhSUC2* (groupe 2) représente des transporteurs de saccharose à forte affinité localisés dans la membrane plasmique. Les membres de ce groupe sont responsables du chargement du phloème, ainsi que de l'import de sucres dans les cellules puits (Sauer, 2007). *RhSUC1* est proche de *HbSUT1A*, *RcSCR1* et *AtSUC1*. *HbSUT1A* et *AtSUC1* joueraient un rôle dans l'importation de saccharose par les cellules laticifères d'Hévéa chez les arbres non exploités (Dusotoit-Coucaud et al., 2009). De même, *AtSUC1* participerait à l'importation de saccharose nécessaires à la germination du grain de pollen (Stadler et al., 1999; Sivitz et al., 2008). *RcSCR1* serait quant à lui impliqué dans les mécanismes de rechargement du saccharose par le phloème de transport dans l'hypocotyle (Eisenbarth et Weig, 2005). Comme *RhSUC1* est principalement exprimé dans la tige, il pourrait jouer un rôle similaire à celui de *RcSCR1*.

RhSUC2 est quant à lui similaire à *HbSUT1(A et B)*, *RcSCR1*, *JrSUT1* et *AtSUC2*. *HbSUT1B* aurait un rôle dans l'importation de saccharose par les cellules laticifères des Hévéas exploités (Dusotoit-Coucaud et al., 2010a). Son rôle serait donc plus important que celui de *HbSUT1A*. *JrSUT1* est exprimé dans les cellules du parenchyme xylémien de la tige (notamment les cellules associées aux vaisseaux) et serait impliqué dans l'approvisionnement en sucres des bourgeons végétatifs au cours du débourrement (Decourteix et al., 2008). Etant localisé spécifiquement dans les cellules compagnes, *AtSUC2* est impliqué dans le chargement du phloème (Stadler et Sauer, 1996). *RhSUC2* est préférentiellement exprimé dans la tige et le bourgeon axillaire, ce qui suggère une implication dans l'approvisionnement en saccharose du bourgeon.

Le groupe 3, auquel appartient *RhSUC3* comprend des transporteurs de saccharose membranaires à faible affinité, se distinguant des autres par une extension de leur extrémité N-terminale et de leur boucle cytoplasmique centrale. Ces transporteurs présentent des motifs de senseurs de sucres mais aucune preuve directe d'une telle fonction n'a été apportée à ce jour (Sauer, 2007). *RhSUC3* est proche de *HbSUT2 (B et C)* et d'*AtSUC3*. La fonction de *HbSUT2 (B et C)* n'est

pas encore connue. *AtSUC3* est exprimé dans de nombreux tissus puits (cellules de garde, trichomes, pollen en cours de germination, apex racinaire...), les cellules du mésophylle et les faisceaux conducteurs du phloème (où sa protéine est localisée dans les tubes criblés) (Meyer et al., 2000, 2004). Il pourrait être impliqué dans l'importation du saccharose par divers tissus puits et dans la récupération du saccharose libéré par le phloème lors du transport à longue distance (Barker et al., 2000; Meyer et al., 2004). *RhSUC3* est uniformément exprimé dans la plupart des organes testés, excepté dans les racines où son expression est faible. Sa fonction est donc difficile à prédire.

RhSUC4 appartient au groupe 4 qui rassemble des transporteurs principalement exprimés dans les tissus puits et dont certains sont tonoplastiques (Sauer, 2007). *RhSUC4* est similaire à *MdSUT1*, *HbSUT4* et *AtSUC4*. *MdSUT1* est un transporteur membranaire capable d'interagir avec le cytochrome *b5*. Cette interaction est impliquée dans des phénomènes de sugar sensing et permet de réguler son activité en fonction de la disponibilité en sucre dans le milieu (Fan et al., 2009). *AtSUC4* est un transporteur tonoplastique à faible affinité exprimé dans certains tissus puits et dans les veines mineures dans les feuilles sources (Weise et al., 2000; Endler et al., 2006). *RhSUC4* est uniformément exprimé dans l'ensemble des organes testés où il pourrait participer au transport tonoplastique du saccharose.

5.2.2 Rôle de *RhSUC2* dans le photocontrôle du débourrement

Chez le rosier, le débourrement conditionnel des bourgeons à la lumière requiert une mobilisation du saccharose du bourgeon et de la portion de tige adjacente (Girault et al., 2010). Nous avons montré que ce processus nécessite une importation de sucres métabolisables tels que le saccharose. D'autre part, il est corrélé à une accumulation de saccharose radiomarqué dans les bourgeons, 96 h après la levée de la dominance apicale. Cette accumulation est notamment plus importante à la lumière qu'à l'obscurité. L'utilisation d'inhibiteurs de la force protomotrice montre que cette accumulation fait intervenir une part active de transport. L'ensemble de ces résultats suggèrent qu'un ou plusieurs transporteurs de saccharose sont impliqués dans l'approvisionnement en sucre des bourgeons lors du photocontrôle du débourrement.

Parmi les trois isoformes de SUC exprimés dans le bourgeon (*RhSUC2*, *RhSUC3* et *RhSUC4*), seul *RhSUC2* présente un taux de transcrits plus important dans les bourgeons en cours de débourrement que dans les bourgeons dormants. Ses transcrits s'accumulent préférentiellement dans la tige et le bourgeon axillaire en cours de débourrement alors que ceux de *RhSUC3* et *RhSUC4* s'accumulent dans tous les organes ou presque. Diverses études montrent que les transporteurs de saccharose spécifiquement exprimés dans un nombre restreint d'organes jouent souvent un rôle important dans les organes où ils sont présents. *AtSUC1*, spécifiquement exprimé dans les tissus floraux est important pour le développement du pollen et participerait également à la déhiscence de l'anthère (Stadler et al., 1999; Sivitz et al., 2008). *AtSUC5* est exprimé spécifiquement dans l'albumen de la graine en formation où il participe à la nutrition des tissus filiaux (albumen et embryon) lors des étapes précoces de son développement (Baud et al., 2005). Chez le noyer, *JrSUT1* est spécifiquement exprimé dans le parenchyme xylémien de la tige où il participerait à la réparation de l'embolie hivernale et à l'approvisionnement en sucre des bourgeons (Decourteix et al., 2006, 2008).

Dans le bourgeon, seul le taux de transcrits de *RhSUC2* est induit par la décapitation. A la lumière, l'induction observée est significative après 48 h et reste stable jusqu'à 96 h. En revanche, à l'obscurité le taux de transcrit de *RhSUC2* revient quasiment au niveau basal dès 48 h. La décapitation provoque le débourrement des bourgeons de rosier cultivés en présence de lum-

ière, alors que ceux maintenus à l'obscurité restent dormants (Khayat et Zieslin, 1982; Girault et al., 2008). Le profil d'expression de *RhSUC2* est donc corrélé à la capacité de débourrement des bourgeons. L'ensemble des résultats obtenus indiquent que ***RhSUC2* participe à l'approvisionnement en sucre du bourgeon végétatif de rosier lors du débourrement. La régulation de son expression serait impliquée dans le photocontrôle de ce processus.**

L'analyse bioinformatique de la séquence codante de *RhSUC2* indique que ce gène code pour une protéine dont la structure est similaire aux transporteurs de saccharose déjà caractérisés (Sauer, 2007). Son expression hétérologue chez la levure démontre qu'il présente les caractéristiques d'un co-transporteur de saccharose/H⁺. Sa capacité d'absorption du saccharose est dépendante du pH et optimale à pH 4.5. L'ajout de protonophore (CCCP) ou d'inhibiteur des groupements thiols (PCMBS) affecte fortement son activité de transport du saccharose. Il présente une forte affinité pour le saccharose ($K_m = 3$ mM). Les expériences de compétitions montrent que son activité est réprimée par le saccharose et le maltose (79 et 57 % respectivement). Ce transporteur serait donc capable de transporter ces deux substrats. Des cas similaires ont été rapportés dans la littérature (Lemoine, 2000). Le glucose et le fructose stimulent l'activité d'absorption du saccharose par *RhSUC2*. Le glucose agirait en stimulant l'activité de l'ATPase/H⁺ chez la levure (Lemoine, 2000). Nous pouvons imaginer que le fructose soit importé par les levures et converti en glucose ou qu'il agirait directement, de la même façon que ce dernier, sur l'activité de l'ATPase/H⁺. ***RhSUC2* est donc un co-transporteur de saccharose/H⁺ à forte affinité.** Ses propriétés cinétiques sont similaires aux transporteurs de saccharose du groupe 2, qui lui sont les plus proches sur le plan phylogénétique. Les transporteurs appartenant à ce groupe sont plasmalemmiques. Etant donné que *RhSUC2* présente de fortes similitudes structurales et fonctionnelles avec ses proches homologues, nous pouvons supposer qu'il est également plasmalemmique. La localisation cellulaire de *RhSUC2* *in planta* pourrait être vérifiée par son immunolocalisation. Cette technique a notamment été utilisée pour localiser les transporteurs de saccharose *LeSUT2* chez la tomate (Barker et al., 2000) et *JrSUT1* chez le noyer (Decourteix et al., 2008), ainsi que le transporteur d'hexoses *VvHT1* chez la vigne (Vignault et al., 2005).

Les transporteurs proches de *RhSUC2* et dont la fonction *in planta* est caractérisée sont impliqués dans le chargement du phloème où dans l'importation de saccharose dans divers tissus puits (Sauer, 2007). *RhSUC2* est fortement similaire à *JrSUT1*, dont l'expression est induite dans les cellules du parenchyme xylémien de la tige, où il participerait à l'approvisionnement en sucre des bourgeons végétatifs nécessaires à leur débourrement lors de la reprise de croissance végétative printanière (Decourteix et al., 2008). Ces données combinées aux propriétés cinétiques et aux profils d'expression de ***RhSUC2*** dans le bourgeon suggèrent que ce transporteur **serait impliqué dans l'importation de saccharose par le bourgeon au cours du débourrement. Il pourrait notamment être responsable de l'influx de sucres dans les cellules puits de ce dernier.**

5.2.3 Régulation de l'expression de *RhSUC2* par les hormones et la lumière

Indépendamment du traitement lumineux appliqué, la décapitation induit transitoirement l'expression de *RhSUC2* au bout de 24 h dans les bourgeons. Cette induction pourrait être due soit à l'effet blessure, soit aux modifications hormonales engendrées par la suppression de la dominance apicale. Des travaux ont d'ailleurs montré que la blessure (Meyer et al., 2004) et certaines hormones : l'éthylène (Chincinska et al., 2008; Dusotoit-Coucaud et al., 2009, 2010a; Tang et al., 2010), les gibbérellines (Chincinska et al., 2008), l'auxine (Harms et al., 1994) et

les cytokinines (Harms et al., 1994) affectent l'expression de divers transporteurs de saccharose au niveau transcriptionnel.

Dans notre étude, la décapitation a été utilisée pour supprimer les phénomènes de dominance apicale et étudier directement l'effet de la lumière sur des bourgeons aptes à débourrer. La décapitation permet notamment de supprimer le flux d'auxine en provenance de l'apex de la tige, responsable de la dominance apicale (Shimizu-Sato et al., 2009; Leyser, 2009). Nous avons montré que l'auxine (à une concentration physiologique, 10 μ M) inhibe spécifiquement l'expression de *RhSUC2* dans le bourgeon à la lumière, alors qu'elle n'a pas d'effet sur l'expression de *RhSUC3* et *RhSUC4*. Nous savons qu'à cette concentration l'auxine inhibe le débourrement des bourgeons à la lumière (Sandrine Pelleschi-Travier, communication personnelle). Ces résultats suggèrent que l'effet de la lumière sur l'expression de *RhSUC2* ne peut s'exprimer qu'en absence de la dominance apicale.

L'induction de *RhSUC2* par la lumière est en accord avec d'autres travaux démontrant que cette dernière régule l'expression de certains transporteurs de sucres. Chez les plantules de riz en cours de germination, on note une accumulation progressive des ARNm du transporteur de saccharose de *OsSUT1* à la lumière, absente à l'obscurité (Matsukura et al., 2000).

Dans notre modèle, l'effet combiné de la décapitation (absence d'auxine) et de la lumière permettent une induction de l'expression de *RhSUC2* dans le bourgeon. De nombreux travaux ont montré que les voies de signalisation impliquées dans la régulation du développement de la plante par la lumière et les hormones peuvent interagir (Alabadí et Blázquez, 2008; Lau et Deng, 2010). Nous pouvons en déduire que **la régulation de l'expression du transporteur de saccharose *RhSUC2* dans le bourgeon implique une interaction entre les voies de réponse à la lumière et aux hormones.**

5.3 Rôle des transporteurs de monosaccharides dans le photocontrôle du débourrement

Les organes puits peuvent importer activement les sucres sous forme de saccharose, d'hexoses ou de polyols (Sauer, 2007; Büttner, 2007). Les transporteurs d'hexoses et de polyols appartiennent à la famille des transporteurs de type monosaccharides (MST-like) (Büttner, 2007). Plusieurs transporteurs d'hexoses sont exprimés dans les organes puits. Ils sont notamment présents dans le bourgeon floral (Szenthe et al., 2007), les feuilles jeunes (Weig et al., 1994; Szenthe et al., 2007), la fleur (Truernit et al., 1996; Gear et al., 2000; Szenthe et al., 2007), le grain de pollen (Scholz-Starke et al., 2003; Schneidereit et al., 2003, 2005), la graine (Weber et al., 1997; Sherson et al., 2000; Takeda et al., 2001; Weschke et al., 2003; Wang et al., 2007), le fruit (Fillion et al., 1999; Gear et al., 2000; Hayes et al., 2007) et les racines (Weig et al., 1994; Truernit et al., 1996; Gear et al., 2000; Dimou et al., 2005). Ces transporteurs sont impliqués dans l'importation des hexoses par les cellules puits ainsi que dans la répartition de ces sucres entre les différents compartiments cellulaires. Des transporteurs de polyols sont également exprimés dans les organes et tissus puits comme les jeunes feuilles en croissance (Gao et al., 2003), les fruits (Gao et al., 2003, 2005; Fan et al., 2009), les cellules laticifères (Dusotoit-Coucaud et al., 2010b), les tissus floraux et la zone d'élongation des racines (Reinders et al., 2005). Ces transporteurs sont responsables de l'importation de polyols par les cellules puits.

Des transporteurs d'hexoses ou de polyols pourraient donc être présents dans le bourgeon et participer au débourrement. Chez le pêcher, les hexoses jouent un rôle plus important que le saccharose ou le sorbitol dans ce processus. Le débourrement s'accompagne notamment d'une importation de glucose par les tissus méristématiques du bourgeon (Maurel et al., 2004), qui pourrait s'opérer par un mécanisme actif (Aue et al., 1999; Gévaudant et al., 2001). Cependant, le transporteur responsable de cette importation n'a pas été identifié. Chez la fève, le transporteur d'hexoses VfSTP1 participe aux étapes précoces de la formation de la graine. Dans l'embryon, son expression est restreinte aux cellules épidermiques mitotiquement actives (Weber et al., 1997). Lors du débourrement, les transporteurs d'hexoses pourraient donc participer à l'importation des sucres lors des étapes précoces de développement du bourgeon, lorsque l'organogénèse a lieu et que l'activité mitotique du méristème est importante. Nous avons donc étudié leur rôle dans la physiologie du bourgeon.

Le sorbitol (polyol) n'est pas un sucre transporté chez le rosier (Zimmermann et Ziegler, 1975; Girault et al., 2010). De plus, l'apport exogène de sorbitol (100 mM) n'induit qu'un faible débourrement et l'inhibe totalement à des concentrations supérieures. Il est donc peu probable que des transports de polyols interviennent dans le bourgeon au cours du débourrement. C'est pourquoi nous avons orienté nos travaux vers l'étude des transporteurs d'hexoses.

5.3.1 Transporteurs d'hexoses exprimés dans le bourgeon axillaire de rosier

Neuf isoformes de transporteurs potentiels de monosaccharides ont été isolées chez le rosier : *RoTMT2*, *RoSGB1*, *RopGlcT*, *RhSTP1*, *RhSTP5*, *RhSTP7*, *RhSTP9*, *RhSTP13A1 et 2* et *RhSTP13B*. Ces gènes appartiennent à la grande famille multigénique des transporteurs de monosaccharides, de polyols et d'inositol (MST-like), comme leurs homologues chez des espèces herbacées (arabette, tomate, riz, maïs et ricin) et ligneuses (vigne et pin). Chez l'arabette ces transporteurs ont été classés en sept sous-familles par Büttner (2007).

RoTMT2 appartient à la sous-famille des TMT (Tonoplast Monosaccharide Transporter). *RoSGB1* et *RopGlcT* appartiennent à la sous-famille des pGlcT/SGB1 (Plastidic Glucose Transporter/Suppressor of G Protein Beta1). *RhSTP1*, *RhSTP5*, *RhSTP7*, *RhSTP9*, *RhSTP13A1 et 2* et *RhSTP13B* appartiennent à la sous-famille des STP (Sugar Transport Protein). Ces sous familles sont respectivement constitués de trois, quatre et quatorze membres chez l'arabette. Les ARNm d'au moins trois des neufs isoformes isolées : *RoTMT2*, *RhSTP1* et *RhSTP9* sont présents dans le bourgeon.

Les TMT seraient des transporteurs d'hexoses tonoplastiques (Carter et al., 2004; Endler et al., 2006; Wormit et al., 2006). *RhTMT2* est similaire à *AtTMT2*, dont les transcrits sont principalement présents dans les racines et les tiges. Une analyse de l'activité du promoteur d'*AtTMT2* démontre qu'il s'exprime également dans les boutons floraux dormants. Son expression est induite par les sucres (hexoses et saccharose) et les stress osmotiques (Wormit et al., 2006). *AtTMT2* pourrait donc jouer un rôle dans la régulation des pressions osmotiques et par conséquent agir sur l'élongation cellulaire. Chez le rosier, ***RhTMT2* est exprimé uniformément dans l'ensemble des organes testés. Son homologie avec *AtTMT2* suggère qu'il pourrait être un transporteur tonoplastique impliqué dans la régulation des pressions osmotiques et de l'élongation cellulaire dans le bourgeon.**

Les STP caractérisés chez l'arabette sont des transporteurs d'hexoses plasmalemmiques à forte affinité. Ces transporteurs catalysent l'influx de sucres dans les cellules (Büttner, 2007).

RhSTP1 est similaire à VvHT1, RcSTC, AtSTP1 et VfSTP1. VvHT1 est un transporteur de glucose à forte affinité (Vignault et al., 2005). Il est principalement exprimé dans la baie de raisin (Fillion et al., 1999) où jouerait un rôle dans l'approvisionnement en monosaccharides nécessaires aux divisions et la croissance cellulaire lors des stades précoces de la formation de cette dernière (Vignault et al., 2005). RcSTC est exprimé dans les organes puits, notamment dans les jeunes feuilles et les racines (Weig et al., 1994). AtSTP1 est un transporteur de monosaccharides exprimé dans les graines en cours de germination et les plantules où il joue un rôle primordial dans l'absorption des sucres extracellulaires (Sherson et al., 2000). AtSTP1 est également exprimé dans les feuilles où il est régulé par la lumière et le rythme circadien (Stadler et al., 2003). VfSTP1 est exprimé dans les cellules épidermiques mitotiquement actives de l'embryon en formation (Weber et al., 1997). Chez le rosier, **RhSTP1** est exprimé dans tous les organes testés mais de façon plus importante dans les feuilles matures et la racine. Ses homologies de séquence et son profil d'expression dans les différents organes de la plante suggèrent qu'il **s'agirait d'un transporteur de monosaccharides plasmalemmiques à forte affinité, qui pourrait notamment participer à l'importation d'hexoses par les cellules puits mitotiquement actives du bourgeon. Il pourrait donc jouer un rôle primordial dans l'approvisionnement en sucre du méristème et des jeunes feuilles en développement lors des étapes précoces du débourrement.**

RhSTP9 est similaire à AtSTP9. AtSTP9 est le seul AtSTP spécifique du glucose. Il est exprimé uniquement dans grain de pollen où participerait aux processus de germination et de croissance du tube pollinique (Schneidereit et al., 2003). Chez le rosier, **RhSTP9** est fortement exprimé dans l'ensemble des organes testés. De même que RhSTP1 il **pourrait être impliqué dans l'importation d'hexoses par les cellules puits du bourgeon.**

5.3.2 Rôle potentiel de *RhSTP1* dans le photocontrôle du débourrement

Nous avons pu étudier l'expression de trois transporteurs potentiels de monosaccharides dans le bourgeon. Parmi ces transporteurs, *RhSTP1* est celui dont la quantité d'ARNm varie le plus dans le bourgeon en réponse à la lumière ou à l'obscurité après la décapitation et l'exposition. La décapitation induit son expression dès 24 h quel que soit le traitement lumineux considéré. Son taux de transcrite diminue ensuite progressivement à la lumière, pour retourner à son niveau basal à 96 h. L'obscurité induit plus fortement et plus stablement l'expression de *RhSTP1* que la lumière et ce jusqu'à 96 h après la décapitation. La quantité de transcrits de *RhSTP1* dans le bourgeon est significativement plus importante à l'obscurité qu'à la lumière entre 48 et 96 h après la décapitation. L'expression de *RhSTP1* est donc induite à la fois par la décapitation et l'obscurité. Ce résultat est en accord avec la forte induction du taux de transcrits d'*AtSTP1* dans la feuille après 1 h d'exposition à l'obscurité (Stadler et al., 2003).

Comme pour *RhSUC2*, l'induction de l'expression de *RhSTP1* par la décapitation pourrait être due à l'effet blessure ou aux modifications hormonales associées à la levée de dominance apicale. Chez l'arabette, la blessure induit localement l'activité des promoteurs d'*AtSTP3* et d'*AtSTP4*. Leur taux de transcrits est également fortement induit par la blessure (Büttner et al., 2000; Truernit et al., 1996). Certaines hormones telles que les cytokinines (Büttner et al., 2000) et l'acide abscissique (Hayes et al., 2010) induisent également l'expression de transporteurs de monosaccharides. Une étude complémentaire est nécessaire pour déterminer si l'induction de *RhSTP1* dans le bourgeon par la décapitation est due aux modifications hormonales causées par la levée de dominance apicale, comme c'est vraisemblablement le cas pour *RhSUC2*.

Nous avons montré que les transcrits de *RhSTP1* s'accumulent plus fortement dans les bourgeons à l'obscurité qu'à la lumière. Ce résultat soulève la question sur le rôle exact de RhSTP1 dans la physiologie du bourgeon. Plusieurs hypothèses sont possibles :

1. RhSTP1 pourrait être impliqué dans des phénomènes de survie cellulaire à l'obscurité, comme cela a été proposé pour la SDH, dont l'expression est stimulée à l'obscurité chez le rosier (Girault et al., 2010). Cependant, l'accumulation d'hexoses radiomarqués n'est pas stimulée dans les bourgeons placés à l'obscurité après la décapitation.
2. Les transcrits de *RhSTP1* pourraient s'accumuler à la lumière comme à l'obscurité, mais n'être traduits qu'en présence de lumière. Divers arguments vont en faveur de cette hypothèse. D'une part, l'accumulation d'hexoses radiomarqués dans les bourgeons est deux fois plus importante à la lumière qu'à l'obscurité entre 72 et 96 h après la décapitation. D'autre part, cette dernière est partiellement active et implique par conséquent l'activité de transporteurs de monosaccharides plasmalemmiques. Parmi les trois transporteurs potentiels de monosaccharides étudiés, seul *RhSTP1* est fortement induit à la lumière suite à la décapitation. Enfin, il a été démontré que la traduction de certains gènes nucléaires et chloroplastiques est inhibée à l'obscurité et/ou induite à la lumière (Berry et al., 1990; Mayfield et al., 1995; Dickey et al., 1998; Kim et al., 2003; Kim et Mullet, 2003). Dans ce contexte, nous pouvons poser comme hypothèse que, bien que le taux de transcrit de *RhSTP1* soit plus élevé à l'obscurité qu'à la lumière, leur traduction serait plus faible à l'obscurité, entraînant ainsi une expression réduite à l'obscurité par rapport à la lumière. Si celle-ci est valide, l'activité de RhSTP1 pourrait expliquer l'augmentation de la force puits du bourgeon vis à vis des hexoses à la lumière après la décapitation. Nous vérifions actuellement cette hypothèse en étudiant le niveau d'ARNm de *RhSTP1* en cours de traduction (ARN polysomiques) dans le bourgeon après décapitation et l'exposition des plantes à la lumière ou à l'obscurité. Il existe des techniques permettant d'isoler les ARN polysomiques (Abe et al., 1992). Une fois isolés les ARNm associés aux polysomes peuvent être purifiés et amplifiés par PCR. Nous pourrions également étudier l'accumulation de la protéine RhSTP1 dans les bourgeons exposés à la lumière ou à l'obscurité par Western blot.

La seconde hypothèse est en adéquation avec le rôle des homologues de RhSTP1 chez l'arabette (*AtSTP1*), la fève (*VfSTP1*) et la vigne (*VvHT1*). *AtSTP1* est un co-transporteur de monosaccharides/H⁺ de la membrane plasmique exprimé dans divers tissus puits et source (Sauer et al., 1990; Sherson et al., 2000; Stadler et al., 2003). L'analyse de mutants *Atstp1* démontre qu'il est responsable de 60 % de l'importation de monosaccharides (glucose, galactose et mannose) par les plantules. *AtSTP1* joue un rôle primordial dans l'importation de sucres extracellulaires par l'embryon et les plantules (Sherson et al., 2000). *VfSTP1* est un transporteur d'hexoses. Lors des étapes précoces de la formation de la graine, ses ARNm sont présents uniquement dans les cellules épidermiques mitotiquement actives de l'embryon où il contribue à leur approvisionnement en hexoses (Weber et al., 1997). *VvHT1* est un co-transporteur de glucose/H⁺ plasmalemmique (Vignault et al., 2005; Hayes et al., 2007) dont les transcrits s'accumulent dans la baie de raisin, et les feuilles jeunes et matures (Fillion et al., 1999; Hayes et al., 2007). Il serait notamment impliqué dans l'approvisionnement en monosaccharides nécessaires aux divisions et à la croissance cellulaire lors des étapes précoces de la formation de la baie (Vignault et al., 2005). **RhSTP1 pourrait participer à l'importation des hexoses nécessaires aux divisions et à la croissance cellulaire lors du débourrement des bourgeons à la lumière.** Dans le bourgeon de rosier, après la décapitation, l'activité de l'invertase pariétale (RhCWI) reste stable à la lumière comme à l'obscurité. Cette enzyme étant nécessaire à la dégradation du

saccharose en hexoses dans l'apoplasme, **la régulation de *RhSTP1* par la lumière serait alors déterminante pour l'approvisionnement en sucre du bourgeon lors des étapes précoces du débourrement.**

5.3.3 Rôle potentiel de *RhTMT2* dans le photocontrôle du débourrement

L'obscurité induit une diminution durable de la quantité d'ARNm de *RhTMT2* dans les bourgeons entre 24 et 96 h après la décapitation. *RhTMT2* est similaire à *AtTMT2*, un transporteur potentiel de monosaccharide localisé dans le tonoplaste et induit en réponse aux stress osmotiques : stress salin et privation d'eau (Carter et al., 2004; Wormit et al., 2006). Ses profils d'expression et sa localisation cellulaire suggèrent un rôle dans l'importation d'hexoses dans la vacuole. ***RhTMT2* pourrait être un transporteur de monosaccharides tonoplastique impliqué dans la régulation des pressions de turgescence et de l'élongation cellulaire. L'inhibition de son expression à l'obscurité (facteur limitant du débourrement) pourrait engendrer une diminution des pressions de turgescence et de l'élongation cellulaire et ainsi participer à l'inhibition du débourrement.**

Cette hypothèse concorde avec l'effet inhibiteur de l'obscurité sur l'élongation cellulaire observé dans les bourgeons de rosier. L'allongement cellulaire des primordia foliaires est réduit chez les bourgeons exposés à l'obscurité par rapport à ceux exposés à la lumière pendant 7 jours après la décapitation (Girault, 2009). Cette régulation de l'allongement cellulaire par la lumière est corrélée à une forte réduction de la quantité de transcrits d'une expansine (*RhEXP*) (Girault, 2009) et d'une aquaporine du plasmalemma *RhPIP2* (Soulaïman Sakr, communication personnelle) dans les bourgeons exposés à l'obscurité entre 24 et 96 h après la décapitation. Les expansines sont des régulateurs clés de la croissance cellulaire. Elles induisent l'extension de la paroi entraînée par la turgescence cellulaire (Li et al., 2003). Les aquaporines sont des canaux qui permettent à l'eau de traverser les membranes (Giuseppe, 2005). **L'inhibition de l'expression de *RhTMT2*, *RhPIP2* et *RhEXP* dans le bourgeon à l'obscurité pourrait engendrer une réduction de la turgescence cellulaire couplée à une inhibition de l'extension de la paroi.** Ces phénomènes seraient à l'origine de la réduction de l'élongation cellulaire et de la croissance des primordia observés chez les bourgeons de rosier exposés à l'obscurité (Girault, 2009).

5.4 Rôle potentiel des sucres dans le bourgeon

Nous avons montré que le débourrement des bourgeons à la lumière nécessite un apport exogène de sucres métabolisables (saccharose, glucose ou fructose) en système *in vitro*. *In planta*, le débourrement conditionnel des bourgeons à la lumière requiert entre autre une mobilisation du saccharose du bourgeon et de la portion de tige adjacente (Girault, 2009). Nous avons également montré que ce processus est corrélé à une induction de la capacité des bourgeons à importer du saccharose et des hexoses (glucose et fructose) radiomarqués. Les hexoses joueraient un rôle plus précoce que le saccharose dans l'approvisionnement en sucre du bourgeon lors du débourrement. L'importation des sucres par les bourgeons fait intervenir une part active de transport. Le transporteur de saccharose *RhSUC2* semble impliqué dans l'approvisionnement en sucre des bourgeons lors du débourrement ainsi que dans la régulation de ce processus par la lumière. Les propriétés cinétiques et la phylogénie de *RhSUC2* suggèrent que ce transporteur est impliqué dans l'importation du saccharose par les cellules puits du bourgeon. Des études complémentaires sont nécessaires afin d'identifier son rôle exact ainsi que le (ou les) transporteur(s) de monosaccharides impliqué(s) dans l'approvisionnement du bourgeon en hexoses.

In planta, l'induction de l'expression du co-transporteur de saccharose/H⁺ *RhSUC2* à la lumière après la décapitation est parallèle à celle de l'invertase vacuolaire *RhVI* dans le bourgeon (Girault et al., 2010). La lumière stimule significativement l'expression de *RhSUC2* par rapport à l'obscurité entre 48 et 96 h après la décapitation. Le taux de transcrit de *RhVI* est quant à lui induit entre 24 et 96 h et son activité entre 48 et 96 h. Ces résultats appuient l'hypothèse d'une implication de *RhSUC2* dans l'importation de saccharose par les cellules puits du bourgeon. Le saccharose importé gagnerait ensuite la vacuole où il serait clivé en hexoses par l'invertase vacuolaire (*RhVI*). Les hexoses produits, ainsi que ceux directement importés dans la cellule par des transporteurs d'hexoses potentiels tels que *RhSTP1*, pourraient alors participer aux processus d'organogénèse et d'allongement du bourgeon de plusieurs façons : (i) en tant que source de carbone et d'énergie ou qu'agent osmotique pour favoriser les divisions et l'élongation cellulaire ou (ii) en tant que molécule signal pour réguler l'expression de gènes impliqués dans le développement du bourgeon.

Chez les végétaux, le glucose régule divers processus développementaux tels que l'embryogénèse, la germination de la graine, le développement des plantules, l'élongation de l'hypocotyle, la formation des racines adventives, la transition de la phase de croissance juvénile à adulte et la senescence (Gibson, 2005). De la même façon, le saccharose pourrait également être perçu comme un signal et réguler l'expression des gènes impliqués dans l'activité du méristème apical caulinaire. Le saccharose régule notamment l'expression de gènes contrôlant le cycle cellulaire (Riou-Khamlichi et al., 2000; Kwon et Wang, 2010). Dans la cellule végétale, il existe plusieurs voies de signalisation impliqués dans la perception des sucres en tant que molécule signal : (i) dépendante de l'hexokinase (HXK), (ii) indépendante de l'HXK et (iii) dépendante de SnRK1 (SNF1-Related Kinase) (Sheen et al., 1999; Halford et Paul, 2003). Les voies dépendantes et indépendante de l'HXK sont impliquées dans la perception et la signalisation du glucose (Sheen et al., 1999) alors que la voie dépendante de SnRK1 serait plutôt impliquée dans la signalisation en réponse à une perturbation de l'état énergétique global de la cellule associé à un stress, une carence en sucre ou à l'obscurité (Baena-González et Sheen, 2008).

La voie dépendante de l'HXK est la plus étudiée. L'hexokinase est une protéine qui peut avoir une double fonction : elle est impliquée dans la phosphorylation et la perception du glucose (Gibson, 2000). La voie dépendante de l'HXK fait intervenir l'activité senseur de l'HXK. Cette voie participe à la répression de la germination par le glucose (Jang et Sheen, 1997). Elle est également impliquée dans la régulation de l'expression de divers gènes par le glucose. Elle participe à l'inhibition des gènes photosynthétiques : CAB1 (chlorophyll a/b-binding protein), PC (plastocyanine), *rbcS* (ribulose-bisphosphate carboxylase small subunit) et l'induction des gènes ERA1 (enhanced response to ABA, impliqué dans la signalisation de l'ABA et le contrôle du cycle cellulaire du méristème) et PLD (phospholipase D, impliqué dans la senescence) (Xiao et al., 2000).

La voie indépendante de l'HXK est impliquée dans la régulation de gènes du métabolisme glucidique, azoté et secondaire et de réponse au stress et aux pathogènes. Les gènes codant pour une invertase pariétale CIN1 (cell wall invertase 1) et la saccharose synthase sont induits par le 6-déoxyglucose, un analogue du glucose non métabolisable (Godt et al., 1995; Roitsch et al., 1995). L'analyse de mutants indique que cette voie est également impliquée dans l'induction des gènes AGPase (ADP-glucose phosphorylase), CHS (chalcone synthase) et PAL1 (phenylalanine ammonia-lyase1) (Xiao et al., 2000).

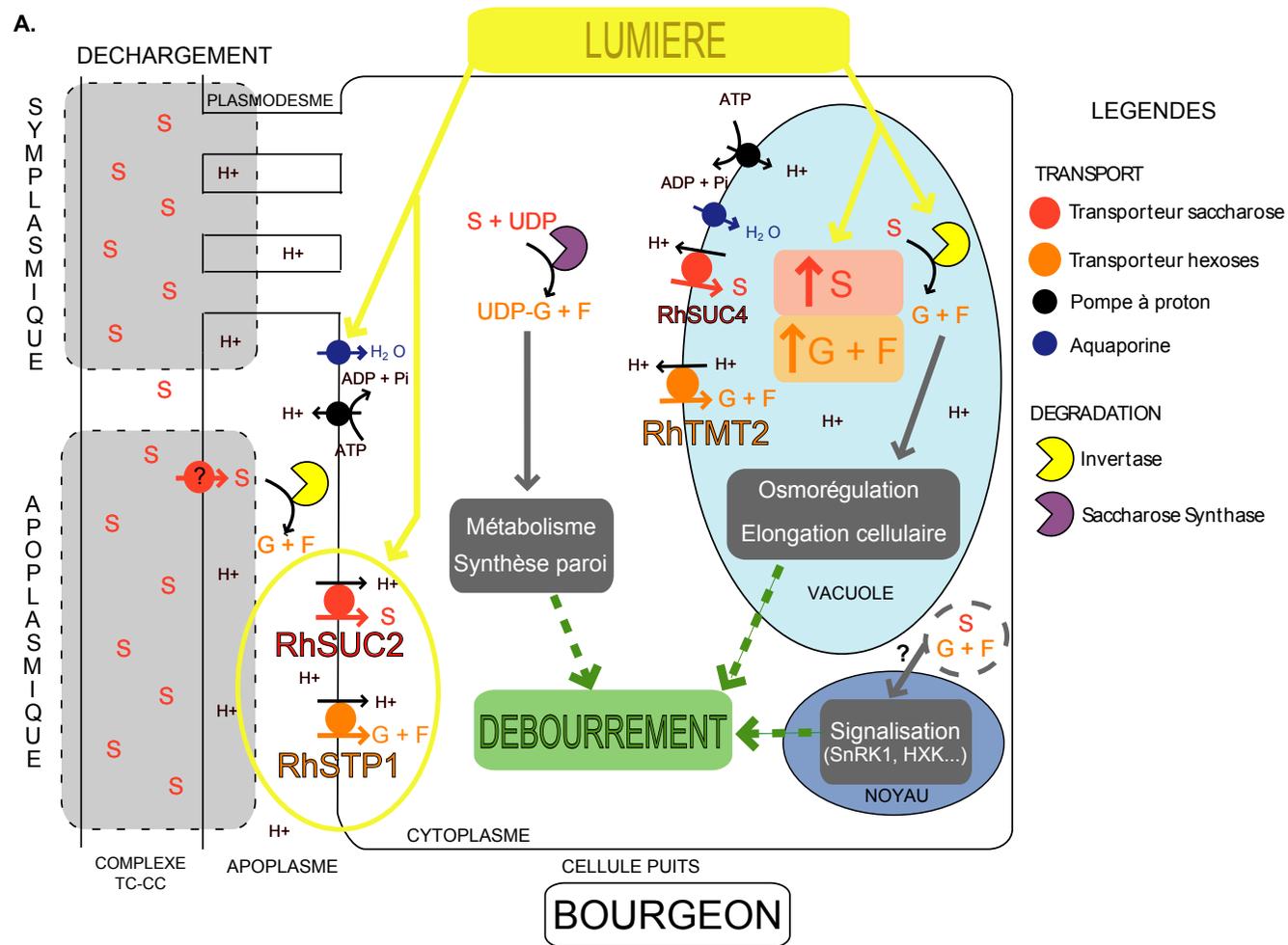
SnRK1 (SnF1-related protein kinase) est une protéine clé de la régulation du métabolisme carboné chez les plantes (Halford et Paul, 2003; Polge et Thomas, 2007). Certaines études démontrent que SnRK1 est impliquée dans des régulations géniques en réponse aux sucres. Chez la pomme de terre, elle participe à l'induction de la sucrose synthase (Sus4) par le saccharose (Purcell et al., 1998), et dans dérégulation du gène de l'alpha-amylase 2 lors d'une carence en glucose (Laurie et al., 2003). De récents travaux mettent en évidence le rôle intégrateur de SnRK1 en réponse à une carence énergétique (Baena-González et Sheen, 2008). L'expression transitoire d'AtKIN10 (un orthologue de SnRK1 chez l'arabette) en protoplastes démontre que ce gène affecte l'expression d'un très grand nombre de gènes (Baena-González et Sheen, 2008). Les profils d'expression induits par AtKIN10 sont très similaires à ceux obtenus dans diverses conditions de carence et d'obscurité (Baena-González et Sheen, 2008). Chez l'arabette, en réponse à une carence énergétique, SnRK1 réprime l'expression de plus de 300 gènes impliqués dans divers processus de biosynthèse incluant la synthèse des acides aminés, de la paroi cellulaire, des lipides, des protéines, du saccharose et de l'amidon. A contrario, SnRK1 induit l'expression de près de 300 gènes impliqués dans divers processus de remobilisation des réserves comme le catabolisme des acides aminés, l'hydrolyse du saccharose, de l'amidon, des parois cellulaires et des polysaccharides, ou la mobilisation et la beta-oxydation des lipides (Baena-González et Sheen, 2008). SnRK1 est exprimé dans le bourgeon végétatif de tomate (Pien et al., 2001) et de rosier (Soulaïman Sakr, communication personnelle). Chez le pois une carence en saccharose stimule l'activité du promoteur de SnRK1. En conditions non carencées, la répression de SnRK1 entraîne une réduction de l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la maintenance et la différenciation du méristème ainsi que dans la formation des feuilles (Radchuk et al., 2010). De plus, la N-Myristoylation de SnRK1 est indispensable au développement du méristème caulinaire (Pierre et al., 2007).

Chez le rosier, le débourrement nécessite une mobilisation des réserves glucidiques du bourgeon et de la portion de tige adjacente. Il fait notamment intervenir des processus d'organogénèse et d'allongement, totalement inhibés à l'obscurité. Girault et al. (2010) a montré qu'en présence de lumière, l'allongement des primordia foliaires est corrélée à une augmentation de la taille des cellules et à l'induction d'un gène codant pour une expansine (*RhEXP*), protéine clé de régulation de l'élongation cellulaire. Les sucres mobilisés par le bourgeon à la lumière pourraient donc avoir un rôle signal et réguler l'expression des gènes impliqués dans les divisions et l'élongation cellulaire. Nous avons montré que l'apport exogène de sucres métabolisables (saccharose, glucose et fructose) en quantité physiologique (250 mM, proche de la concentration phloémienne chez diverses espèces) aux bourgeons favorise leur débourrement à l'obscurité. Cependant, leur effet sur ces processus est moins important à l'obscurité qu'à la lumière. **L'apport exogène de sucres métabolisables au bourgeon en quantité physiologique permet donc de compenser partiellement l'absence de lumière, qui reste indispensable au débourrement optimal du bourgeon.** Nos résultats concordent avec des travaux réalisés chez l'arabette démontrant que les sucres stimulent le développement des plantes à l'obscurité. En effet, un apport exogène de saccharose stimule le développement et la floraison des plantes à l'obscurité, bien que ce dernier soit légèrement retardé chez les plantules maintenues à l'obscurité par rapport à celles exposées à la lumière (Roldan et al., 1999). Le saccharose et les hexoses (glucose et fructose) agissent notamment sur la croissance des plantules à l'obscurité en stimulant fortement l'allongement de l'hypocotyle. Cependant, à la lumière, le saccharose aurait un léger effet inhibiteur sur ce processus (Zhang et al., 2010).

L'ensemble des résultats obtenus sur le rosier, ainsi que les données bibliographiques indiquent que **les sucres importés dans le bourgeon participeraient à la régulation des divisions et de l'élongation cellulaire nécessaires au débourrement. Ils stimuleraient l'activité**

organogénique du méristème ainsi que l'allongement du bourgeon.

De récents travaux réalisés au laboratoire montrent que les sucres seraient perçus comme une molécule signal par le bourgeon et participeraient à la régulation du débourrement (Amélie Rabot, communication personnelle). Le palatinose (analogue du saccharose (Ferne et al., 2001)), le psicose (analogue du fructose phosphorylé par l'hexokinase et la fructokinase (Kato-Noguchi et al., 2005)) et le 3-O-méthylglucose (un analogue du glucose non phosphorylé par l'hexokinase (Pego et al., 1999)) favorisent le débourrement des bourgeons, avec un effet plus marqué du palatinose et du psicose. Indiquant que la voie indépendante de l'hexokinase stimulerait le processus de débourrement. A contrario, le 2-déoxyglucose, un analogue du glucose phosphorylé par l'hexokinase (Pego et al., 1999), ne permet pas le débourrement. Ce résultat indique que la voie dépendante de l'hexokinase n'interviendrait pas dans ce processus ou qu'elle pourrait être impliquée dans un phénomène de rétrocontrôle négatif de ce dernier. Le glucose-6-P et le tréhalose-6-P, des inhibiteurs de l'activité de SnRK1 (Toroser et al., 2000; Zhang et al., 2009), permettent également le débourrement des bourgeons à la lumière. Ces résultats obtenus chez le rosier, ainsi que les données bibliographiques suggèrent une implication de SnRK1 dans le contrôle du débourrement, consistante avec une limitation de ce dernier par SnRK1 lors d'une carence énergétique (absence de sucre ou obscurité). **Les sucres sont donc des acteurs clés de la régulation du débourrement. Ils agiraient sur ce processus en tant que source de carbone et d'énergie ainsi que de molécule signal.** Des études complémentaires sont cependant nécessaires afin de déterminer leur rôle exact dans ce processus et les mécanismes physiologiques et moléculaires qui le contrôlent.



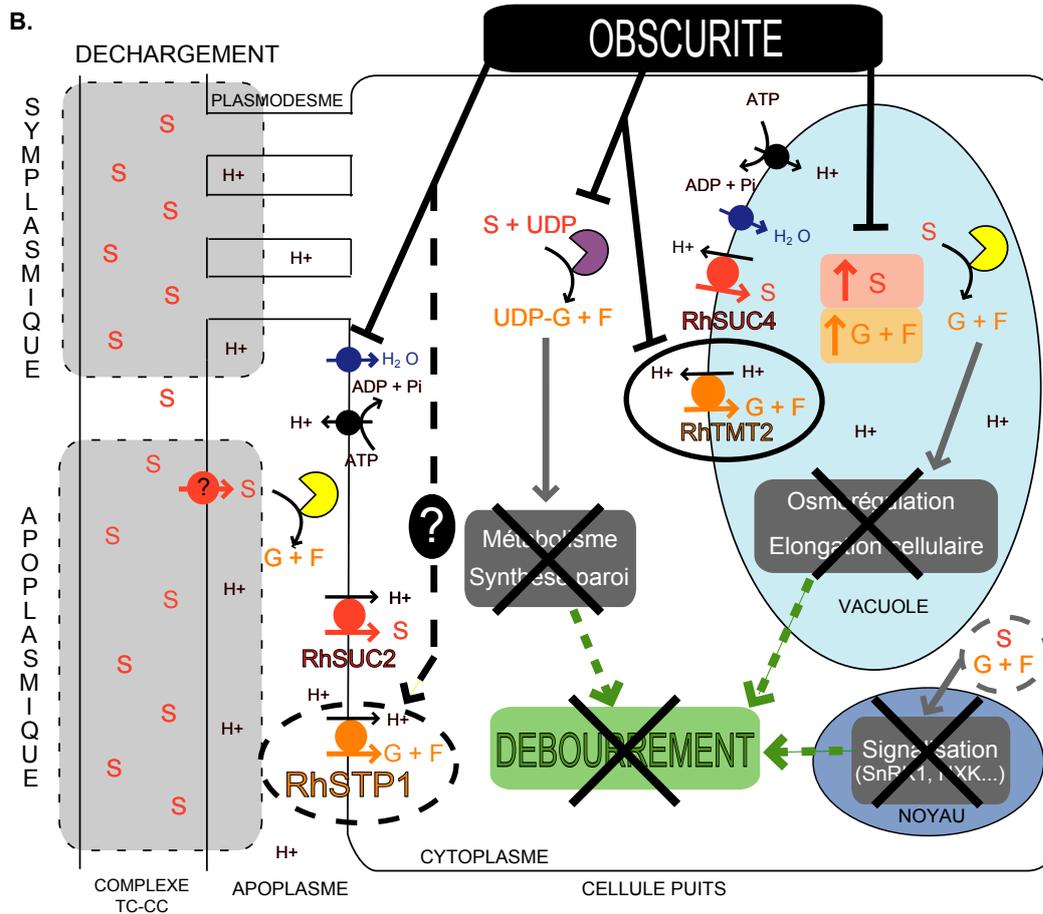


FIGURE 26 – Modèle du rôle des sucres dans le photocontrôle du débourrement du bourgeon végétatif de rosier. A. La lumière favorise le débourrement en stimulant l'importation et l'utilisation des sucres en provenance de la tige. B. L'obscurité inhibe le débourrement en limitant la force puits du bourgeon. Les schémas représentent les effets stimulateurs (flèches) et inhibiteurs (flèches barrées) de la lumière et de l'obscurité sur le déchargement, le transport et le rôle des sucres (saccharose : S, glucose : G et fructose : F) dans le bourgeon. Les processus physiologiques impliqués dans le débourrement et régulés par les sucres sont représentés dans des encadrés gris. Les transporteurs de sucres régulés par la lumière et potentiellement impliqués dans le photocontrôle du débourrement sont entourés.

Chapitre 6

Conclusions et Perspectives

Nous avons confirmé que le bourgeon de rosier est un organe puits qui nécessite d'importer des sucres métabolisables pour débourrer à la lumière. Des transporteurs de saccharose et de monosaccharides participeraient à l'approvisionnement en sucre du bourgeon au cours du débourrement. La régulation du débourrement par la lumière passe par une modulation de leur expression et de la force puits du bourgeon. D'autre part, nous avons montré qu'un apport exogène de sucre à des concentrations physiologiques au bourgeon permet de compenser partiellement l'effet inhibiteur de l'obscurité sur le débourrement.

Grâce à l'ensemble des résultats obtenus et en nous appuyant sur les données bibliographiques, nous proposons un modèle du rôle des sucres dans le photocontrôle du débourrement du bourgeon végétatif de rosier (Figure 26).

Dans ce modèle, les étapes précoces du débourrement à la lumière (pendant les 72 h qui suivent la décapitation, sachant que le débourrement s'effectue généralement en 96 h) impliquent que le saccharose en provenance de la tige soit déchargé du phloème par voie symplasmique via des plasmodesmes et par voie apoplasmique via l'activité de transporteurs d'efflux ou de facilitateurs de saccharose non encore identifiés. Une fois dans l'apoplasme, ce dernier serait majoritairement clivé en hexoses par l'activité de l'invertase pariétale (RhCWI). Ces hexoses, importés dans les cellules puits par des transporteurs plasmalemmiques (tels que RhSTP1, dont l'expression est fortement induite dès 24 h après la décapitation). Une fois dans la cellule, les hexoses sont métabolisés ou agissent en tant que molécules signal pour réguler l'activité du méristème, les divisions et l'élongation cellulaire ou être importés dans la vacuole par des transporteurs d'hexoses tonoplastiques (tels que RhTMT2), où ils provoquent un appel d'eau, une augmentation de la turgescence cellulaire et ainsi l'élongation des cellules. L'expression d'une aquaporine du plasmalemme (*RhPIP2*), responsable de l'entrée d'eau dans la cellule, est d'ailleurs fortement induite par la lumière entre 24 et 96 h après la décapitation.

Lors d'étapes plus tardives du débourrement à la lumière (entre 72 et 96 h), le saccharose déchargé du phloème par voie apoplasmique pourrait être importé dans les cellules puits sous forme d'hexoses ou de saccharose. L'importation de ce dernier serait assurée par le co-transporteur de saccharose/H⁺ (RhSUC2), dont l'expression est induite par la lumière entre 48 et 96 h après la décapitation. Une fois dans la cellule, le saccharose, clivé en hexoses par la saccharose synthase (RhSUSY), agirait en tant que molécule signal ou serait importé dans la vacuole par un transporteur de saccharose tonoplastique (RhSUC4). Il y serait alors rapidement clivé en hexoses par l'invertase vacuolaire (RhVI), dont l'activité est induite par la lumière (entre 48 à 96 h), favorisant ainsi l'élongation cellulaire.

A l'obscurité, condition inhibitrice des processus d'organogénèse et d'allongement à l'origine du débourrement, le transport des sucres vers les cellules puits du bourgeon est moins important qu'à la lumière, bien que l'expression (accumulation de transcrits) du transporteur d'hexoses *RhSTP1* soit fortement stimulée entre 24 et 96 h. L'expression de la saccharose synthase *RhSUSY* est également fortement inhibée, limitant la dégradation du saccharose en hexoses dans le cytoplasme et ainsi son utilisation pour les divisions et la croissance cellulaire. L'obscurité inhiberait également l'expression de l'aquaporine *RhPIP2* et du transporteur d'hexoses tonoplastique *RhTMT2* provoquant ainsi une diminution des pressions de turgescence limitante à l'élongation cellulaire. La diminution des quantités de sucres importés par les cellules puits pourrait également être perçue comme un signal de carence énergétique par RhSnRK1. Une cascade de signalisation serait alors déclenchée pour réprimer l'expression de gènes impliqués dans l'anabolisme et stimuler celles des gènes impliqués dans le catabolisme. RhSnRK1 pourrait également réguler l'activité du méristème.

Le travail que nous avons réalisé a permis de mettre en évidence le rôle primordial des transporteurs de sucres dans le photocontrôle du débourrement du bourgeon végétatif de rosier. Il nous a permis de compléter les connaissances acquises sur les mécanismes moléculaires et physiologiques impliqués dans ce processus et ouvre des portes à de nouvelles questions. Il serait notamment intéressant de répondre aux questions suivantes :

1. A quel moment la force puits des bourgeons est elle modifiée ?

Nos travaux ont permis de démontrer que la force puits des bourgeons vis à vis des sucres est induite à la lumière entre 72 et 96 h après la décapitation. Elle est notamment plus importante à la lumière qu'à l'obscurité dès 72 h pour les hexoses et 96 h pour le saccharose. Afin de connaître la chronologie exacte des événements prenant place lors des étapes précoces du photocontrôle du débourrement, il serait intéressant d'étudier la force puits des bourgeons à la lumière ou à l'obscurité, 24 et 48 h après la décapitation.

2. Quels sont les transporteurs de monosaccharides réellement impliqués dans l'importation d'hexoses par les cellules puits du bourgeon à la lumière ?

Nos travaux ont permis de démontrer que les hexoses joueraient un rôle plus précoce que le saccharose dans l'approvisionnement en sucre du bourgeon lors de son débourrement, régulé par la lumière. L'importation des hexoses par les cellules puits du bourgeon implique une part de transport actif, qui pourrait être assurée par des transporteurs d'hexoses plasmalemmique tels que ceux de la sous-famille des STP. Parmi les six isoformes de STP que nous avons isolées chez le rosier, nous avons uniquement pu étudier l'expression de *RhSTP1* et *RhSTP9* dans le bourgeon en relation avec le photocontrôle du débourrement. Seule l'expression de *RhSTP1* varie en réponse à la lumière.

La lumière induit l'accumulation des transcrits de *RhSTP1*, de même que l'obscurité, et ce de manière plus importante et durable. Cependant, des travaux ont montré que la traduction de certains ARNm pouvait être inhibée à l'obscurité et/ou induite à la lumière (Berry et al., 1990; Mayfield et al., 1995; Dickey et al., 1998; Kim et al., 2003; Kim et Mullet, 2003). Afin de déterminer le rôle exact de RhSTP1 dans la physiologie du bourgeon et sa réponse à la lumière, il est nécessaire de savoir si ses ARNm sont traduits de la même façon à la lumière qu'à l'obscurité. En ce sens, nous avons entrepris une étude du niveau de transcrits en cours de traduction (ARN polysomiques) dans les bourgeons après décapitation et exposition des plantes à la lumière ou à l'obscurité.

Il serait également intéressant de déterminer si d'autres STP sont exprimés dans le bourgeon de rosier et impliqués dans la régulation du débourrement par la lumière. Pour ce faire nous avons dans un premiers temps entrepris d'isoler les séquences complètes des ARNm des STP que nous avons identifiés chez le rosier et ainsi disposer du matériel nécessaire pour désigner des amorces spécifiques de chacune des isoformes. Si aucune isoforme n'est induite différentiellement à la lumière par rapport à l'obscurité (ARNm et ARN polysomiques), il serait intéressant d'identifier si d'autres transporteurs de monosaccharides pourraient être impliqués dans l'importation d'hexoses par les cellules puits. Les meilleurs candidats après les STP seraient les PMT, qui sont fortement exprimés dans les cellules puits, localisés dans la membrane plasmique et dont certains d'entre eux ont récemment été démontrés capables de transporter des hexoses comme le glucose et le fructose (Klepek et al., 2005, 2010). Les SWEET pourraient également être impliqués dans l'importation facilitée des hexoses par les bourgeons (Chen et al., 2010).

3. Dans quelles zones du bourgeon les différents transporteurs de sucres jouent t'ils un rôle ?

Nous avons démontré qu'au moins un transporteur de saccharose et un ou plusieurs transporteurs d'hexoses participeraient à l'approvisionnement en sucre du bourgeon pour permettre son débourrement à la lumière. Afin de déterminer le rôle exact de ces transporteurs dans la physiologie du bourgeon, il serait intéressant de localiser leurs sites d'expression dans cette structure. Pour ce faire nous avons entrepris de localiser les sites d'accumulation de leurs ARNm dans le bourgeon par hybridation *in situ*. Il serait également intéressant de localiser les protéines correspondantes par immunolocalisation.

4. L'expression des transporteurs de sucres impliqués dans le débourrement est elle corrélée au profil de débourrement le long de l'axe chez des plantes entières ?

Nous avons démontré que l'expression de certains transporteurs était régulée par la lumière dans les bourgeons après la décapitation et participeraient ainsi au photocontrôle du débourrement. Il serait intéressant d'étudier l'expression de ces mêmes transporteurs dans les bourgeons d'une plante entière en relation avec le profil de débourrement de ces derniers le long de l'axe (bourgeons apicaux en cours de débourrement et bourgeons basaux dormants).

Des travaux réalisés au laboratoire ont permis de montrer que des alternances d'éclairage en PAR fort/PAR faible ou vice versa modifient le profil de débourrement le long de l'axe d'ordre I chez des rosiers non décapités (Wassim Azri, communication personnelle). Il serait donc intéressant d'étudier l'expression de *RhSUC2* et *RhSTP1* dans ces différentes conditions pour mieux cerner son rôle dans le débourrement et sa régulation par la lumière.

5. Quelles sont les voies de signalisation impliquées dans la régulation des transporteurs par la lumière et les hormones ?

Nous avons démontré que l'expression de certains transporteurs de sucres chez le rosier pouvait être régulé à la fois par la lumière et la décapitation. L'expression de *RhSUC2* est également régulée par l'auxine. Dans un premier temps, il serait intéressant de vérifier s'il en va de même pour *RhSTP1* et les autres transporteurs de monosaccharides qui pourraient être co-régulés par la lumière et la diminution des quantités d'auxine en provenance de l'apex (via la levée de dominance apicale causée par la décapitation).

Dans un second temps, il serait intéressant d'étudier les voies de signalisation impliquées dans la régulation de ces transporteurs en réponse aux hormones et à la lumière. En effet, à l'heure actuelle peu de données sont disponibles à ce sujet. Kühn et Grof (2010) ont proposé que la régulation de l'expression du transporteur StSUT4 par la lumière serait contrôlée par le phytochrome B, bien qu'aucune preuve directe de l'implication de ce dernier n'ait été apportée.

Une étude des facteurs de transcriptions se fixant au promoteur des gènes d'intérêt (*RhSUC2*, *RhSTP1* et *RhTMT2*) et régulant leur expression en réponse à la lumière ou aux hormones nous permettrait notamment d'identifier des acteurs des voies de signalisations impliquées dans le photocontrôle du débourrement.

6. L'expression des transporteurs de sucres dans le bourgeon est elle régulée par leur propre substrat ?

Nous avons démontré qu'en présence de lumière, un apport exogène de sucre métabolisables est nécessaire au débourrement. Chez les plantes décapitées l'importation de sucres radiomarqués ainsi que l'expression de certains transporteurs de sucres est régulé par la lumière. Le débourrement est également induit par un apport de sucres en absence de lumière, condition normalement inhibitrice du débourrement chez les plantes décapitées. De récents travaux menés au laboratoire indiquent que les sucres joueraient un rôle signal dans le débourrement. Les données bibliographiques démontrent que ces derniers peuvent réguler l'expression de certains transporteurs de sucre (Chiou et Bush, 1998; Conde et al., 2006; Wormit et al., 2006). Il pourrait en être de même chez le rosier, où ce processus participerait à la régulation du débourrement en fonction des ressources énergétiques accessibles au bourgeon. Nous pourrions donc étudier le niveau d'expression des transporteurs de sucres dans le bourgeon en réponse à un apport exogène de différents sucres (mannitol, saccharose, glucose et fructose). Par la suite, l'utilisation d'analogues de sucres pourrait nous permettre d'identifier les voies de signalisation impliquées dans leur régulation.

7. Quels est le rôle signal des différents sucres dans le bourgeon et les voies de signalisation impliquées ?

De récents travaux conduits au sein de l'équipe ont permis de démontrer un rôle signal des sucres dans le débourrement. Dans la bibliographie peu de données sont disponibles sur le rôle signal des sucres sur l'activité du méristème végétatif caulinaire et le processus de débourrement, ainsi que sur les voies de signalisation impliquées dans la régulation de ces processus. Cette question est abordée dans le cadre des travaux de thèse d'Amélie Rabot et de François Barbier, qui visent à déterminer le(s) sucre(s) perçus comme signal par le bourgeon, les processus physiologiques et moléculaires régulés par ce(s) dernier(s) et les voies de signalisation impliquées.

8. Quelles sont les interaction entre les voies de signalisation par la lumière, les hormones et les sucres pour réguler le débourrement ?

Les hormones, la lumière et les sucres régulent le débourrement du bourgeon végétatif de rosier de par leur rôle signal. Ces derniers peuvent avoir des effets antagonistes ou complémentaires sur le débourrement. Des interactions entre les voies de signalisation par les hormones et la lumière (Alabadí et Blázquez, 2008; Lau et Deng, 2010), la lumière et les sucres (Thum et al., 2003) et les hormones et les sucres (Gibson, 2004, 2005) ont déjà été démontrées. Il serait donc intéressant de déterminer si de telles interactions interviennent dans le contrôle du débourrement et des processus physiologiques que celui-ci

implique. Pour ce faire il faudrait identifier les acteurs moléculaires impliqués dans la perception et la transmission de ces différents signaux et leurs éventuelles interactions.

Nous pourrions notamment identifier ces acteurs en étudiant le comportement de mutants des voies de signalisation/perception de la lumière, des hormones et des sucres chez une espèce modèle qui réponde à la lumière comme le rosier. Nathalie Leduc a notamment entrepris des travaux en ce sens. Alternativement, nous pourrions rechercher les acteurs impliqués dans ces différentes voies de signalisation par l'étude des éléments *cis* et *trans* impliqués dans la régulation des gènes participant au photocontrôle du débournement.

L'utilisation de mutants pourrait également s'avérer indispensable pour caractériser les éventuelles interactions entre les différentes voies de signalisation impliquées dans le photocontrôle du débournement. Elle permettrait notamment de constater si la mutation d'une des voies de signalisation affecte la réponse aux autres voies impliquées.

i>i

Bibliographie

- S. Abe, Y. Ito, and E. Davies. Co-sedimentation of actin tubulin and membranes in the cytoskeleton fractions from peas and mouse 3t3 cells. *Journal of Experimental Botany*, 43 :941–949, 1992.
- A. Ageorges, N. Issaly, S. Picaud, S. Delrot, and C. Romieu. Identification and functional expression in yeast of a grape berry sucrose carrier. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38 (3) :177–185, 2000.
- A.A. Al-Khateeb. Regulation of in vitro bud formation of date palm (phoenix dactylifera l.) cv. khanezi by different carbon sources. *Bioresource Technology*, 99(14) :6550–6555, 2008.
- D. Alabadí and M.A. Blázquez. Integration of light and hormone signals. *Plant Signaling and Behavior*, 3(7) :448–449, 2008.
- B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Molecular biology of the cell, 4th edition*, chapter Chapter 11. Membrane transport of small molecules and the electrical properties of membranes. Garland Science, 2002.
- S. Aluri and M.Büttner. Identification and functional expression of the Arabidopsis thaliana vacuolar glucose transporter 1 and its role in seed germination and flowering. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(7) :2537–2542, 2007.
- E. Antony, T. Taybi, M. Courbot, S.T. Mugford, J.A.C. Smith, and A.M. Borland. Cloning, localization and expression analysis of vacuolar sugar transporters in the cam plant Ananas comosus (pineapple). *Journal of Experimental Botany*, 59(7) :1895–1908, 2008.
- N. Aoki, T. Hirose, G.N. Scofield, P.R. Whitfeld, and R.T. Furbank. The sucrose transporter gene family in rice. *Plant and Cell Physiology*, 44(3) :223–232, 2003.
- R. Arora, L.J. Rowland, and K. Tanino. Induction and release of bud dormancy in woody perennials : a science comes of age. *Hortscience*, 38(5) :911–921, 2003.
- E.L. Arumingtyas, R.S. Floyd, M.J. Gregory, and I.C. Murfet. Branching in Pisum : inheritance and allelism tests with 17 ramosus mutants. *Pisum Genetics*, 24 :17–31, 1992.
- R. Atanassova, M. Leterrier, C. Gaillard, A. Agasse, E. Sagot, P. Coutos-Thevenot, and S. Delrot. Sugar-regulated expression of a putative hexose transport gene in grape. *Plant Physiology*, 131(1) :326–334, 2003.
- H.-L. Aue, I. Lecomte, M. Gendraud, and G. Pétel. Change in plasma membrane ATPase activity during dormancy release of vegetative peach-tree buds. *Physiologia Plantarum*, 106 (1) :41–46, 1999.
- E. Baena-González and J. Sheen. Convergent energy and stress signaling. *Trends in Plant Science*, 13(9) :474–482, September 2008.

- L. Barker, C. Kühn, A. Weise, A. Schulz, C. Gebhardt, B. Hirner, H. Hellmann, W. Schulze, J.M. Ward, and W.B. Frommer. SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *Plant Cell*, 12(7) :1153–1164, 2000.
- I. Barth, S. Meyer et N. Sauer. PmSUC3 : Characterization of a SUT2/SUT3-type sucrose transporter from plantago. *Plant Cell*, 15(6) :1375–1385, 2003.
- D. Barthélémy, F. Blaise, T. Fourcaud, and E. Nicolini. Modélisation et simulation de l'architecture des arbres : Bilan et perspectives. *Revue Forestière Française*, 47(NS) :71–96, 1995.
- D. Barthélémy, J. Crabbé, C. Edelin, P.-E. Lauri, J. Mauget, W. Moore, R. Rageau, P. Raimbault, J.L. Regnard, and J.D. Viéumont. *Thesaurus de termes de morphologie et morphogénèse des arbres*. 2000.
- G.A. Bartlett and W.R. Remphrey. The effect of reduced quantities of photosynthetically active radiation on *Fraxinus pennsylvanica* growth and architecture. *Canadian Journal of Botany*, 76 :1359–1365, 1998.
- S. Baud, S. Wuillème, R. Lemoine, M. Kronenberger, J. Caboche, L. Lepiniec, and C. Rochat. The AtSUC5 sucrose transporter specifically expressed in the endosperm is involved in early seed development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 43(6) :824–836, 2005.
- T. Bennett, T. Sieberer, B. Willett, J. Booker, C. Luschnig, and O. Leyser. The *Arabidopsis* MAX pathway controls shoot branching by regulating auxin transport. *Current Biology*, 16 (6) :553–563, 2006.
- G. Bernacchia and A. Furinib. Biochemical and molecular responses to water stress in resurrection plants. *Physiologia Plantarum*, 121 :175–181, 2004.
- J.O. Berry, D.E. Breiding, and D.F. Klessig. Light-mediated control of translational initiation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in amaranth cotyledons. *The Plant Cell*, 2(8) :795–803, 1990.
- I. Bohn-Courseau. Auxin : A major regulator of organogenesis. *Comptes Rendus Biologies*, 333 :290–296, 2010.
- A. Bonicel and A. Vercosa de Médeiros Raposo. Variation of starch and soluble sugars in selected sections of polar buds during dormancy and post-dormancy. *Plant Physiology and Biochemistry*, 28 :577–586, 1990.
- J. Booker, T. Sieberer, W. Wright, L. Williamson, B. Willett, B. Stirnberg, C. Turnbull, M. Srinivasan, P. Goddard, and O. Leyser. MAX1 encodes a cytochrome P450 family member that acts downstream of MAX3/4 to produce a carotenoid-derived branch-inhibiting hormone. *Developmental Cell*, 8(3) :443–449, 2005.
- R. Borchert. Unusual shoot growth pattern in a tropical tree, *Oreopanax* (Araliaceae). *American Journal of Botany*, 56(9) :1033–1041, 1969.
- R. Boumaza, S. Demotes-Mainard, L. Huché-Théliér, and V. Guérin. Visual characterization of the esthetic quality of the rosebush. *Journal of Sensory Studies*, 24(23) :774–796, 2009.
- R. Boumaza, L. Huché-Théliér, S. Demotes-Mainard, E. Le Coz, N. Leduc, S. Pelleschi-Travier, E.M. Qannari, S. Sakr, P. Santagostini, R. Symoneaux, and V. Guérin. Sensory profiles and preference analysis in ornamental horticulture : The case of the rosebush. *Food Quality and Preference*, In Press, Corrected Proof :–, 2010.

- M. Büttner. The monosaccharide transporter(-like) gene family in Arabidopsis. *FEBS Letters Plant Transporters and Channels*, 581(12) :2318–2324, 2007.
- M. Büttner and N. Sauer. Monosaccharide transporters in plants : structure, function and physiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1465(1-2) :263–274, 2000.
- M. Büttner, E. Truernit, K. Baier, J. Scholz-Starke, M. Sontheim, C. Lauterbach, V.A.R. Huss, and N. Sauer. AtSTP3, a green leaf-specific, low affinity monosaccharide-h⁺ symporter of Arabidopsis thaliana. *Plant, Cell and Environment*, 23(2) :175–184, 2000.
- L. Burkle, J.M. Hibberd, W.P. Quick, C. Kühn, B. Hirner, and W.B. Frommer. The H⁺-sucrose cotransporter NtSUT1 is essential for sugar export from tobacco leaves. *Plant Physiology*, 118(1) :59–68, 1998.
- B. Cakir, A. Agasse, C. Gaillard, A. Saumonneau, S. Delrot, and R. Atanassova. A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. *The Plant Cell*, 15(9) :2165–2180, 2003.
- Y. Caraglio and D. Barthélémy. *Modélisation et simulation de l'architecture des végétaux*, Revue critique des termes relatifs à la croissance et la ramification des végétaux vasculaires, pages 11–87. Bouchon, J. and de Reffye, P. and Barthélémy D. eds, 1997.
- C. Carter, S. Pan, J. Zouhar, E.L. Avila, T. Girke, and N.V. Raikhel. The vegetative vacuole proteome of Arabidopsis thaliana reveals predicted and unexpected proteins. *The Plant Cell*, 16(12) :3285–3303, 2004.
- P. Champagnat. Rest and activity in vegetative buds of trees. *Annales des Sciences Forestières*, 46 :9–26, 1989.
- P. Champagnat, P. Barnola, and S. Lavarenne. Quelques modalités de la croissance rythmique endogène des tiges chez les végétaux ligneux. In *Compte rendu du Colloque International de l'Arbre*, number no. h.s, pages 303–337. Naturalia Monspelienis, 1986.
- D. Chandran, A. Reinders, and J.M. Ward. Substrate specificity of the Arabidopsis thaliana sucrose transporter AtSUC2. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(45) :44320–44325, 2003.
- L.-Q. Chen, B.-H. Hou, S. Lalonde, H. Takanaga, M.L. Hartung, X.-Q. Qu, W.-J. Guo, J.-G. Kim, W. Underwood, B. Chaudhuri, D. Chermak, G. Antony, F.F. White, S.C. Somerville, M.B. Mudgett, and W.B. Frommer. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature*, 468(7323) :527–532, November 2010.
- I.A. Chincinska, J. Liesche, U. Krugel, J. Michalska, P. Geigenberger, B. Grimm, and C. Kühn. Sucrose transporter StSUT4 from potato affects flowering, tuberization, and shade avoidance response. *Plant Physiology*, 146(2) :515–528, 2008.
- T.-J. Chiou and D.R. Bush. Molecular cloning, immunochemical localization to the vacuole, and expression in transgenic yeast and tobacco of a putative sugar transporter from sugar beet. *Plant Physiology*, 110(2) :511–520, 1996.
- T.-J. Chiou and D.R. Bush. Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(8) :4784–4788, April 1998.

- J.I. Cho, B. Burla, D.W. Lee, N. Ryoo, S.K. Hong, H.B. Kim, J.S. Eom, S.B. Choi, M.H. Cho, S.H. Bhoo, T.R. Hahn, H.E. Neuhaus, E. Martinoia, and J.S. Jeon. Expression analysis and functional characterization of the monosaccharide transporters, OsTMTs, involving vacuolar sugar transport in rice (*Oryza sativa*). *New Phytologist*, 186(3) :657–668, 2010.
- S.E. Clark. Organ formation at the vegetative shoot meristem. *The Plant Cell*, 9(7) :1067–1076, 1997.
- M.G Cline. Concepts and terminology of apical dominance. *American Journal of Botany*, 84 (8) :1064–1069, 1997.
- C. Conde, A. Agasse, D. Glissant, R. Tavares, H. Geros, and S. Delrot. Pathways of glucose regulation of monosaccharide transport in grape cells. *Plant Physiology*, 141(4) :1563–1577, 2006.
- A. Cottignies. *Dormance et croissance active du frêne (Fraxinus excelsior L.)*. PhD thesis, Université de Paris VI, 1985. 215 p.
- L. Crespel, M. Chirillet, C.E. Durel, D. Zhang, J. Meynet, and S. Gudin. Mapping of qualitative and quantitative phenotypic traits in *Rosa* using AFLP markers. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 105(8) :1207–1214, 2002.
- T. Czechowski, M. Stitt, T. Altmann, M.K. Udvardi, and W.-R. Scheible. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 139(1) :5–17, 2005.
- T. Davies, C. Wolf and S.P. Robinson. Three putative sucrose transporters are differentially expressed in grapevine tissues. *Plant Science*, 147(2) :93–100, 1999.
- E. de Fay, V. Vacher, and F. Humbert. Water-related phenomena in winter buds and twigs of *Picea abies* l. (karst.) until bud-burst : A biological, histological and nmr study. *Annals of Botany*, 86(6) :1097–1107, December 2000.
- M. Decourteix, G. Alves, N. Brunel, T. Améglio, A. Guilliot, R. Lemoine, G. Pétel, and S. Sakr. JrSUT1, a putative xylem sucrose transporter, could mediate sucrose influx into xylem parenchyma cells and be up-regulated by freeze-thaw cycles over the autumn-winter period in walnut tree (*Juglans regia* l.). *Plant, Cell and Environment*, 29(1) :36–47, 2006.
- M. Decourteix, G. Alves, M. Bonhomme, M. Peuch, K.B. Baaziz, N. Brunel, A. Guilliot, R. Rageau, T. Améglio, G. Pétel, and S. Sakr. Sucrose (JrSUT1) and hexose (JrHT1 and JrHT2) transporters in walnut xylem parenchyma cells : their potential role in early events of growth resumption. *Tree Physiology*, 28(2) :215–224, 2008.
- S. Delrot, R. Atanassova, and L. Maurousset. Regulation of sugar, amino acid and peptide plant membrane transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1465(1-2) : 281–306, 2000.
- S. Delrot, R. Atanassova, E. Gomès, and P. Coutos-Thévenot. Plasma membrane transporters : a machinery for uptake of organic solutes and stress resistance. *Plant Science*, 161(3) :391–404, 2001.
- L.F. Dickey, M.E. Petracek, T.T. Nguyen, E.R. Hansen, and W.F. Thompson. Light regulation of FED-1 mRNA requires an element in the 5' untranslated region and correlates with differential polyribosome association. *The Plant Cell*, 10(3) :475–484, 1998.

- M. Dimou, E. Flemetakis, C. Delis, G. Aivalakis, K.G. Spyropoulos, and P. Katinakis. Genes coding for a putative cell-wall invertase and two putative monosaccharide/H⁺ transporters are expressed in roots of etiolated glycine max seedlings. *Plant Science*, 169(4) :798–804, 2005.
- S. Dinant. Phloème, transport interorgane et signalisation à longue distance. *Comptes Rendus Biologies*, 331(5) :334–346, 2008.
- B. Ding, M.V. Parthasarathy, K. Niklas, and R. Turgeon. A morphometric analysis of the phloem-unloading pathway in developing tobacco leaves. *Planta*, 176 :307–318, 1988.
- E.A. Dun, B.J. Ferguson, and C. A. Beveridge. Apical dominance and shoot branching. divergent opinions or divergent mechanisms. *Plant Physiology*, 142(3) :812–819, 2006.
- A. Dusotoit-Coucaud, N. Brunel, P. Kongsawadworakul, U. Viboonjun, A. Lacoïnte, J.L. Julien, H. Chrestin, and S. Sakr. Sucrose importation into laticifers of *Hevea brasiliensis*, in relation to ethylene stimulation of latex production. *Annals of Botany*, 104(4) :635–647, 2009.
- A. Dusotoit-Coucaud, P. Kongsawadworakul, L. Maurousset, U. Viboonjun, N. Brunel, V. Pujade-Renaud, H. Chrestin, and S. Sakr. Ethylene stimulation of latex yield depends on the expression of a sucrose transporter (HbSUT1b) in rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Tree Physiology*, 30(12) :1586–1598, 2010a.
- A. Dusotoit-Coucaud, B. Porcheron, N. Brunel, P. Kongsawadworakul, J. Franchel, U. Viboonjun, H. Chrestin, R. Lemoine, and S. Sakr. Cloning and characterization of a new polyol transporter (HbPLT2) in *Hevea brasiliensis*. *Plant and Cell Physiology*, 2010b.
- R. Ehness and T. Roitsch. Co-ordinated induction of mRNAs for extracellular invertase and a glucose transporter in *Chenopodium rubrum* by cytokinins. *The Plant Journal*, 11(3) : 539–548, 1997.
- D.A. Eisenbarth and A.R. Weig. Sucrose carrier RcSCR1 is involved in sucrose retrieval, but not in sucrose unloading in growing hypocotyls of *Ricinus communis* l. *Plant Biology (Stuttgart)*, 7(01) :98–103, 2005.
- A. Endler, S. Meyer, S. Schelbert, T. Schneider, W. Weschke, S.W. Peters, F. Keller, S. Baginsky, E. Martinoia, and U.G. Schmidt. Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and *Arabidopsis* mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach. *Plant Physiology*, 141(1) : 196–207, 2006.
- A. Erez, M. Faust, and M.J. Line. Changes in water status in peach buds on induction, development and release from dormancy. *Scientia Horticulturae*, 73(2-3) :111–123, 1998.
- R.C. Fan, C.C. Peng, Y.H. Xu, X.F. Wang, Y. Li, Y. Shang, S.Y. Du, R. Zhao, X.Y. Zhang, L.Y. Zhang, and D.P. Zhang. Apple sucrose transporter SUT1 and sorbitol transporter SOT6 interact with cytochrome b5 to regulate their affinity for substrate sugars. *Plant Physiology*, 150(4) :1880–1901, 2009.
- M. Faust, D. Liu, M.M. Millard, and G.W. Stutte. Bound versus free water in dormant apple buds a theory for endodormancy. *HortScience*, 26(7) :887–890, 1991.
- B.J. Ferguson and C.A. Beveridge. Roles for auxin, cytokinin, and strigolactone in regulating shoot branching. *Plant Physiology*, 149(4) :1929–1944, 2009.

- A.R. Fernie, U. Roessner, and P. Geigenberger. The sucrose analog palatinose leads to a stimulation of sucrose degradation and starch synthesis when supplied to discs of growing potato tubers. *Plant Physiology*, 125(4) :1967–1977, April 2001.
- L. Fillion, A. Ageorges, S. Picaud, P. Coutos-Thevenot, R. Lemoine, C. Romieu, and S. Delrot. Cloning and expression of a hexose transporter gene expressed during the ripening of grape berry. *Plant Physiology*, 120(4) :1083–1094, 1999.
- S. A. Finlayson, S.R. Krishnareddy, T.H. Kebrom, and J.J. Casal. Phytochrome regulation of branching in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 152(4) :1914–1927, 2010.
- J. Fustec and F. Beaujard. Effect of photoperiod and nitrogen supply on basal shoots development in *Rhododendron catawbiense*. *Biologia Plantarum*, 43(4) :511–515, 2000.
- Z. Gao, L. Maurousset, R. Lemoine, S.-D. Yoo, S. van Nocker, and W. Loescher. Cloning, expression, and characterization of sorbitol transporters from developing sour cherry fruit and leaf sink tissues. *Plant Physiology*, 131(4) :1566–1575, 2003.
- Z. Gao, S. Jayanty, R. Beaudry, and W. Loescher. Sorbitol transporter expression in apple sink tissues : Implications for fruit sugar accumulation and watercore development. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130(2) :261–268, 2005.
- M.L. Gear, M.L. McPhillips, J.W. Patrick, and D.W. McCurdy. Hexose transporters of tomato : molecular cloning, expression analysis and functional characterization. *Plant Molecular Biology*, 44(5) :687–697, 2000.
- S.I. Gibson. Plant sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web. *Plant Physiology*, 124(4) :1532–1539, 2000.
- S.I. Gibson. Sugar and phytohormone response pathways : navigating a signalling network. *Journal of Experimental Botany*, 55(395) :253–264, 2004.
- S.I. Gibson. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Current Opinion in Plant Biology Growth and Development*, 8(1) :93–102, 2005.
- T. Girault. *Etude du photocontrôle du développement du bourgeon chez le rosier (Rosa sp. L.) : impact de la lumière sur le métabolisme glucidique et l'élongation cellulaire*. PhD thesis, Université d'Angers, 2009.
- T. Girault, V. Bergougnoux, D. Combes, J.-D. Viéumont, and N. Leduc. Light controls shoot meristem organogenic activity and leaf primordia growth during bud burst in *Rosa* sp. *Plant, Cell and Environment*, 31(11) :1534–1544, 2008.
- T. Girault, F. Abidi, M. Sigogne, S. Pelleschi-Travier, R. Boumaza, S. Sakr, and N. Leduc. Sugars are under light control during bud burst in *Rosa* sp. *Plant, Cell and Environment*, 33(8) :1339–1350, 2010.
- A. Gisel, S. Barella, F.D. Hempel, and P.C. Zambryski. Temporal and spatial regulation of symplastic trafficking during development in *Arabidopsis thaliana* apices. *Development*, 126(9) :1879–1889, 1999.
- C. Giuseppe. Aquaporins : highways for cells to recycle water with the outside world. *Biology of the Cell*, 97 :351–353, 2005.

- D.E. Godt, A. Riegel, and T. Roitsch. Regulation of sucrose synthase expression in *Chenopodium rubrum* : Characterization of sugar induced expression in photoautotrophic suspension cultures and sink tissue specific expression in plants. *Journal of Plant Physiology*, 146 : 231–238, 1995.
- V. Gomez-Roldan, S. Fermas, P.B. Brewer, V. Puech-Pages, E.A. Dun, J.-P. Pillot, F. Letisse, R. Matusova, S. Danoun, J.-C. Portais, H. Bouwmeester, G. Becard, C.A. Beveridge, C. Rameau, and S.F. Rochange. Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*, 455(7210) : 189–194, 2008.
- D. Gordon, C. Damiano, and T.M. DeJong. Preformation in vegetative buds of *Prunus persica* : factors influencing number of leaf primordia in overwintering buds. *Tree Physiology*, 26(4) : 537–544, April 2006.
- S. Gudín. Rose : genetics and breeding. *Plant Breeding Reviews*, 17 :159–189, 2000.
- Y. Guédon, J.G. Puntieri, S. Sabatier, and D. Barthélémy. Relative extents of preformation and neof ormation in tree shoots : Analysis by a deconvolution method. *Annals of Botany*, 98(4) : 835–844, 2006.
- F. Gévaudant, G. Pétel, and A. Guillot. Differential expression of four members of the H⁺-ATPase gene family during dormancy of vegetative buds of peach trees. *Planta*, 212(4) : 619–626, 2001.
- A. Hackel, N. Schauer, F. Carrari, A. R. Fernie, B. Grimm, and C. Kühn. Sucrose transporter LeSUT1 and LeSUT2 inhibition affects tomato fruit development in different ways. *The Plant Journal*, 45(2) :180–192, 2006.
- T. Halaly, X. Pang, T. Batikoff, O. Crane, A. Keren, J. Venkateswari, A. Ogorovitch, A. Sadka, S. Lavee, and E. Or. Similar mechanisms might be triggered by alternative external stimuli that induce dormancy release in grape buds. *Planta*, 228(1) :79–88, 2008.
- N.G. Halford and M.J. Paul. Carbon metabolite sensing and signalling. *Plant Biotechnology Journal*, 1(6) :381–398, 2003.
- K. Harms, R.V. Wöhner, B. Schulz, and W.B. Frommer. Isolation and characterization of p-type H⁺-ATPase genes from potato. *Plant Molecular Biology*, 26 :979–988, 1994.
- S. Haupt, G.H. Duncan, S. Holzberg, and K.J. Oparka. Evidence for symplastic phloem unloading in sink leaves of barley. *Plant Physiology*, 125(1) :209–218, 2001.
- M.A. Hayes, C. Davies, and I.B. Dry. Isolation, functional characterization, and expression analysis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) hexose transporters : differential roles in sink and source tissues. *Journal of Experimental Botany*, 58(8) :1985–1997, 2007.
- M. A. Hayes, A. Feechan, and I. B. Dry. Involvement of abscisic acid in the coordinated regulation of a stress-inducible hexose transporter (Vvht5) and a cell wall invertase in grapevine in response to biotrophic fungal infection. *Plant Physiology*, 153(1) :211–221, 2010.
- O.M. Heide. Dormancy release in beech buds (*Fagus sylvatica*) requires both chilling and long days. *Physiologia Plantarum*, 89(1) :187–191, 1993a.
- O.M. Heide. Daylength and thermal time responses of budburst during dormancy release in some northern deciduous trees. *Physiologia Plantarum*, 88(4) :531–540, 1993b.

- O.M. Heide and A.K. Prestrud. Low temperature, but not photoperiod, controls growth cessation and dormancy induction and release in apple and pear. *Tree Physiology*, 25(1) :109–114, January 2005.
- J.M. Hibberd and W.P. Quick. Characteristics of C4 photosynthesis in stems and petioles of C3 flowering plants. *Nature*, 415(6870) :451–454, January 2002.
- T. Hirose, N. Imaizumi, G.N. Scofield, R.T. Furbank, and R. Ohsugi. cDNA cloning and tissue specific expression of a gene for sucrose transporter from rice (*Oryza sativa* l.). *Plant and Cell Physiology*, 38(12) :1389–1396, January 1997.
- L.C. Ho. Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39(1) :355–378, 1988.
- J. Hofmann, P.H. Hess, D. Szakasits, A. Blochl, K. Wiecek, S. Daxbock-Horvath, H. Bohlmann, A.J.E. van Bel, and F.M.W. Grundler. Diversity and activity of sugar transporters in nematode-induced root syncytia. *Journal of Experimental Botany*, 60(11) :3085–3095, 2009.
- D.P. Horvath, J.V. Anderson, W.S. Chao, and M.E. Foley. Knowing when to grow : signals regulating bud dormancy. *Trends Plant Science*, 8(11) :534–540, November 2003.
- A. Imlau, E. Truernit, and N. Sauer. Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *The Plant Cell*, 11(3) :309–322, 1999.
- S. Ishikawa, M. Maekawa, T. Arite, K. Onishi, I. Takamura, and J. Kyozuka. Suppression of tiller bud activity in tillering dwarf mutants of rice. *Plant and Cell Physiology*, 46(1) :79–86, January 2005.
- J.-C. Jang and J. Sheen. Sugar sensing in plants. *Trends in Plant Science*, 2 :208–214, 1997.
- D. Johnson, J. Hill, and M. Thomas. The monosaccharide transporter gene family in land plants is ancient and shows differential subfamily expression and expansion across lineages. *BMC Evolutionary Biology*, 6(1) :64, 2006.
- H. Kato-Noguchi, T. Takaoka, and K. Izumori. Psicose inhibits lettuce root growth via a hexokinase-independent pathway. *Physiologia Plantarum*, 125(3) :293–298, 2005.
- T.H. Kebrom, B.L. Burson, and S.A. Finlayson. Phytochrome b represses teosinte branched1 expression and induces sorghum axillary bud outgrowth in response to light signals. *Plant Physiology*, 140(3) :1109–1117, 2006.
- T. Keilin, X. Pang, J. Venkateswari, T. Halaly, O. Crane, A. Keren, A. Ogradovitch, R. Ophir, H. Volpin, D. Galbraith, and E. Or. Digital expression profiling of a grape-bud est collection leads to new insight into molecular events during grape-bud dormancy release. *Plant Science*, 173(4) :446–457, 2007.
- E. Khayat and N. Zieslin. Environmental factors involved in the regulation of sprouting of basal buds in rose plants. *Journal of Experimental Botany*, 33(6) :1286–1292, 1982.
- C. Kühn. A comparison of the sucrose transporter systems of different plant species. *Plant Biology*, 5(3) :215–232, 2003.
- C. Kühn and C.P.L. Grof. Sucrose transporters of higher plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(3) :287–297, 2010.

- C. Kühn, V.R. Franceschi, A. Schulz, R. Lemoine, and W.B. Frommer. Macromolecular trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements. *Science*, 275(5304) :1298–1300, 1997.
- J. Kim and J.E. Mullet. A mechanism for light-induced translation of the RBC1 mRNA encoding the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in barley chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 44(5) :491–499, May 2003.
- J.-Y. Kim, H.-R. Song, B.L. Taylor, and I.A. Carre. Light-regulated translation mediates gated induction of the Arabidopsis clock protein LHY. *The EMBO Journal*, 22(4) :935–944, February 2003.
- T. Kiyosue, H. Abe, K Yamaguchi-Shinozaki, and K. Shinozaki. ERD6, a cDNA clone for an early dehydration-induced gene of Arabidopsis, encodes a putative sugar transporter. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1370(2) :187–191, 1998.
- Y.-. Klepek, D. Geiger, R. Stadler, F. Klebl, L. Landouar-Arsivaud, R. Lemoine, R. Hedrich, and N. Sauer. 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(1) :204–218, 2005.
- Y.-S. Klepek, M. Volke, K.R. Konrad, K. Wippel, S. Hoth, R. Hedrich, and N. Sauer. Arabidopsis thaliana polyol/monosaccharide transporters 1 and 2 : fructose and xylitol/H⁺ symporters in pollen and young xylem cells. *Journal of Experimental Botany*, 61(2) :537–550, January 2010.
- A.A. Kotov and L.M. Kotova. Changes in the water status and rheological characteristics of pea seedling axillary buds during their transitions growth-dormancy-growth in apical dominance. *Russian Journal of Plant Physiology*, 57(6) :840–851, 2010.
- U. Krugel, L.M. Veenhoff, J. Langbein, E. Wiederhold, J. Liesche, T. Friedrich, B. Grimm, E. Martinoia, B. Poolman, and C. Kühn. Transport and sorting of the *Solanum tuberosum* sucrose transporter SUT1 is affected by posttranslational modification. *The Plant Cell*, 20(9) :2497–2513, 2008.
- H.K. Kwon and My.H. Wang. The D-type cyclin gene (*nicta;cycD3;4*) controls cell cycle progression in response to sugar availability in tobacco. *Journal of Plant Physiology*, In Press, Corrected Proof :–, 2010.
- S. Lalonde, M. Tegeder, M. Throne-Holst, W.B. Frommer, and J.W. Patrick. Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. *Plant, Cell and Environment*, 26(1) :37–56, 2003.
- G.A. Lang, J.D. Early, G.C. Martin et R.L. Darnell. Endo-, para- and ecodormancy : physiological terminology and classification for dormancy research. *Hortscience*, 22(3) :371–377, 1987.
- O.S. Lau and X.W. Deng. Plant hormone signaling lightens up : integrators of light and hormones. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(5) :571–577, 2010.
- S. Laurie, R.S. McKibbin, and N.G. Halford. Antisense SNF1-related (SnRK1) protein kinase gene represses transient activity of an alpha-amylase (*alpha-Amy2*) gene promoter in cultured wheat embryos. *Journal of Experimental Botany*, 54(383) :739–747, February 2003.

- R. Le Hir, N. Leduc, E. Jeannette, J.-D. Viéumont, and S. Pelleschi-Travier. Variations in sucrose and ABA concentrations are concomitant with heteroblastic leaf shape changes in a rhythmically growing species (*Quercus robur*). *Tree Physiology*, 26(2) :229–238, 2006.
- R. Lemoine. Sucrose transporters in plants : update on function and structure. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1465(1-2) :246–262, 2000.
- R. Lemoine, L. Bürkle, L. Barker, S. Sakr, C. Kühn, M. Regnacq, C. Gaillard, S. Delrot, and W.B. Frommer. Identification of a pollen-specific sucrose transporter-like protein NtSUT3 from tobacco. *FEBS Letters*, 454(3) :325–330, 1999.
- O. Leyser. The fall and rise of apical dominance. *Current Opinion in Genetics & Development*, 15(4) :468–471, 2005.
- O. Leyser. The control of shoot branching : an example of plant information processing. *Plant, Cell and Environment*, 32(6) :694–703, 2009.
- C.-J. Li, E. Guevara, J. Herrera, and F. Bangerth. Effect of apex excision and replacement by 1-naphthylacetic acid on cytokinin concentration and apical dominance in pea plants. *Physiologia Plantarum*, 94(3) :465–469, 1995.
- X. Li, L. Jones, and S. McQueen-Mason. Expansins and cell growth. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(6) :603–610, 2003.
- A. Ludwig, J. Stolz, and N. Sauer. Plant sucrose-H⁺/symporters mediate the transport of vitamin H. *The Plant Journal*, 24(4) :503–509, 2000.
- M. Lundmark, A.M. Cavaco, S. Trevanion, and V. Hurry. Carbon partitioning and export in transgenic *Arabidopsis thaliana* with altered capacity for sucrose synthesis grown at low temperature : a role for metabolite transporters. *Plant, Cell and Environment*, 29(9) :1703–1714, 2006.
- A. Lytovchenko, U. Sonnewald, and A.R Fernie. The complex network of non-cellulosic carbohydrate metabolism. *Current Opinion in Plant Biology Physiology and Metabolism*, 10(3) : 227–235, 2007.
- C.A.M. Marcelis-van Acker. Ontogeny of axillary buds and shoots in roses : leaf initiation and pitch development. *Scientia Horticulturae*, 57(1-2) :111–122, 1994.
- T.R. Marks and S.E. Simpson. Effect of irradiance on shoot development in vitro. *Plant Growth Regulation*, 28 :133–142, 1999.
- C. Marquat, M. Vandamme, M. Gendraud, and G. Pétel. 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(3-4) :151–162, 1999.
- M. Martin, F. Piola, D. Chessel, M. Jay, and P. Heizmann. The domestication process of the modern rose : genetic structure and allelic composition of the rose complex. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 102 :398–404, 2001.
- C.-A. Matsukura, T. Saitoh, T. Hirose, R. Ohsugi, P. Perata, and J. Yamaguchi. Sugar uptake and transport in rice embryo. expression of companion cell-specific sucrose transporter (OsSUT1) induced by sugar and light. *Plant Physiology*, 124(1) :85–94, 2000.

- S. Matsumoto, M. Kouchi, J. Yabuki, M. Kusunoki, Y. Ueda, and H. Fukui. Phylogenetic analyses of the genus *Rosa* using the *matk* sequence : molecular evidence for the narrow genetic background of modern roses. *Scientia Horticulturae*, 77(1-2) :73–82, 1998.
- K. Maurel, S. Sakr, F. Gerbe, A. Guilliot, M. Bonhomme, R. Rageau, and G. Pétel. Sorbitol uptake is regulated by glucose through the hexokinase pathway in vegetative peach-tree buds. *Journal of Experimental Botany*, 55(398) :879–888, 2004.
- S P Mayfield, C B Yohn, A Cohen, and A Danon. Regulation of chloroplast gene expression. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 46(1) :147–166, 1995.
- S. Meyer, M. Melzer, E. Truernit, C. Hummer, R. Besenbeck, R. Stadler, and N. Sauer. AtSUC3, a gene encoding a new Arabidopsis sucrose transporter, is expressed in cells adjacent to the vascular tissue and in a carpel cell layer. *The Plant Journal*, 24(6) :869–882, 2000.
- S. Meyer, C. Lauterbach, M. Niedermeier, I. Barth, R.D. Sjolund, and N. Sauer. Wounding enhances expression of AtSUC3, a sucrose transporter from Arabidopsis sieve elements and sink. *Plant Physiology*, 134(2) :684–693, 2004.
- J. Meynet. *Dossiers de l'environnement de l'INRA*, volume 21, chapter Les rosiers cultivés, une très longue histoire d'exploitation de la biodiversité seulement pour le plaisir et l'art de vivre, pages 113–118. 2001.
- E. Münch. *Die Stoffbewegungen in der Pflanze*. Gustav Fischer, 1930.
- P. Morel, G. Galopin, and N. Donès. Using architectural analysis to compare the shape of two hybrid tea rose genotypes. *Scientia Horticulturae*, 120(3) :391–398, 2009.
- S.E. Morris, M.C.H. Cox, J.J. Ross, S. Krisantini, and C.A. Beveridge. Auxin dynamics after decapitation are not correlated with the initial growth of axillary buds. *Plant Physiology*, 138 (3) :1665–1672, 2005.
- L.M. Mortensen. Effects of air humidity on growth, flowering, keeping quality and water relations of four short-day greenhouse species. *Scientia Horticulturae*, 86(4) :299–310, 2000.
- R. Muleo and S. Morini. Light quality regulates shoot cluster growth and development of MM106 apple genotype in in vitro culture. *Scientia Horticulturae*, 108(4) :364–370, May 2006.
- R. Muleo and S. Morini. Physiological dissection of blue and red light regulation of apical dominance and branching in M9 apple rootstock growing in vitro. *Journal of Plant Physiology*, 165(17) :1838–1846, 2008.
- R. Muleo, S. Morini, and S. Casano. Photoregulation of growth and branching of plum shoots : Physiological action of two photosystems. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 37 :609–617, 2001.
- H. Nienstaedt. Dormancy and dormancy release in white spruce. *Forest Science*, 12(11) : 374–384, 1966.
- T. Niittyla, A.T. Fuglsang, M.G. Palmgren, W.B. Frommer, and W.X. Schulze. Temporal analysis of sucrose-induced phosphorylation changes in plasma membrane proteins of Arabidopsis. *Molecular Cell Proteomics*, 6(10) :1711–1726, 2007.
- E.T. Nilsen. The influence of water stress on leaf and stem photosynthesis in *Spartium junceum* L. *Plant, Cell and Environment*, 15(4) :455–461, 1992.

- M.H.H. Norholm, H.H. Nour-Eldin, P. Brodersen, J. Mundy, and B.A. Halkier. Expression of the Arabidopsis high-affinity hexose transporter STP13 correlates with programmed cell death. *FEBS Letters*, 580(9) :2381–2387, 2006.
- R.A.A. Oldeman. *L'architecture de la forêt guyanaise*. PhD thesis, CNRS 7787 Montpellier, 1974.
- S.N. Oliver, E.S. Dennis, and R. Dolferus. ABA regulates apoplastic sugar transport and is a potential signal for cold-induced pollen sterility in rice. *Plant and Cell Physiology*, 48(9) : 1319–1330, September 2007.
- V. Ongaro and O. Leyser. Hormonal control of shoot branching. *Journal of Experimental Botany*, 59(1) :67–74, 2008.
- K.J. Oparka. What is phloem unloading ? *Plant Physiology*, 94(2) :393–396, 1990.
- K.J. Oparka, A.G. Roberts, P. Boevink, S. Santa Cruz, I. Roberts, K.S. Pradel, A. Imlau, G. Kotlizky, N. Sauer, and B. Epel. Simple, but not branched, plasmodesmata allow the nonspecific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. *Cell*, 97(6) :743–754, 1999.
- D. Patel and K.A. Franklin. Temperature-regulation of plant architecture. *Plant Signaling and Behavior*, 4(7) :577 – 579, 2009.
- J.W. Patrick. Phloem unloading : Sieve element unloading and post-sieve element transport. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48(1) :191–222, 1997.
- E. Paus, J. Nilsen, and O. Juntila. Bud dormancy and vegetative growth in *Salix polaris* ; as affected by temperature and photoperiod. *Polar Biology*, 6 :91–95, 1986.
- J.V. Pego, P.J. Weisbeek, and S.C.M. Smeeckens. Mannose inhibits Arabidopsis germination via a hexokinase-mediated step. *Plant Physiology*, 119(3) :1017–1024, 1999.
- Y. Pezet-si Mohamed. *Caractérisation des potentialités morphogéniques du châtaigner *Castanea sativa* MILLER. Distribution et possibilités de translocation des réserves insolubles et solubles associées à des gradients de pH intracellulaires*. PhD thesis, Université de Clermont-Ferrand II, 1987. 99 p.
- M.W. Pfaffl. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29 :e45, 2001.
- S. Pien, J. Wyrzykowska, and A.J. Fleming. Novel marker genes for early leaf development indicate spatial regulation of carbohydrate metabolism within the apical meristem. *The Plant Journal*, 25(6) :663–674, 2001.
- M. Pierre, J.A. Traverso, B. Boisson, S. Domenichini, D. Bouchez, C. Giglione, and T. Meinel. N-myristoylation regulates the SnRK1 pathway in Arabidopsis. *Plant Cell*, 19(9) :2804–2821, 2007.
- C. Polge and M. Thomas. SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control ? *Trends Plant Science*, 12(1) :20–28, January 2007.
- E.W. Pop, S.F. Oberbauer, and G. Starr. Predicting vegetative bud break in two arctic deciduous shrub species, *Salix pulchra* and *Betula nana*. *Oecologia*, 124 :176–184, 2000.

- J.G. Puntieri, M. Stecconi, and D. Barthélémy. Preformation and neof ormation in shoots of *Nothofagus antarctica* (g. forster) oerst. (Nothofagaceae) shrubs from northern patagonia. *Annals of Botany*, 89(6) :665–673, June 2002.
- P.C. Purcell, A.M. Smith, and N.G. Halford. Antisense expression of a sucrose non-fermenting-1-related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose synthase in tubers and loss of sucrose-inducibility of sucrose synthase transcripts in leaves. *The Plant Journal*, 14(2) :195–202, 1998.
- B.F. Quirino, W.-D. Reiter, and R.D. Amasino. One of two tandem Arabidopsis genes homologous to monosaccharide transporters is senescence-associated. *Plant Molecular Biology*, 46(4) :447–457, 2001.
- R. Radchuk, R.N. Emery, D. Weier, H. Vigeolas, P. Geigenberger, J.E. Lunn, R. Feil, W. Weschke, and H. Weber. Sucrose non-fermenting kinase 1 (SnRK1) coordinates metabolic and hormonal signals during pea cotyledon growth and differentiation. *The Plant Journal*, 61(2) :324–338, 2010.
- S. Rajapakse, D.H. Byrne, L. Zhang, N. Anderson, K. Arumuganathan, and R.E. Ballard. Two genetic linkage maps of tetraploid roses. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 103 :575–583, 2001.
- W.D. Ransom-Hodgkins, M.W. Vaughn, and D.R. Bush. Protein phosphorylation plays a key role in sucrose-mediated transcriptional regulation of a phloem-specific proton-sucrose symporter. *Planta*, 217 :483–489, 2003.
- A. Reinders, W. Schulze, C. Kühn, L. Barker, A. Schulz, J.M. Ward, and W.B. Frommer. Protein-protein interactions between sucrose transporters of different affinities colocalized in the same enucleate sieve element. *Plant Cell*, 14(7) :1567–1577, 2002.
- A. Reinders, J.A. Panshyshyn, and J.M. Ward. Analysis of transport activity of arabidopsis sugar alcohol permease homolog AtPLT5. *Journal of Biological Chemistry*, 280(2) :1594–1602, January 2005.
- A. Reinders, A. Sivitz, C. Starker, J. Gantt, and J. Ward. Functional analysis of LjSUT4, a vacuolar sucrose transporter from *Lotus japonicus*. *Plant Molecular Biology*, 68 :289–299, 2008.
- D. Rentsch, M. Laloi, I. Rouhara, E. Schmelzer, S. Delrot, and W.B. Frommer. NTR1 encodes a high affinity oligopeptide transporter in Arabidopsis. *FEBS Letters*, 370(3) :264–268, 1995.
- J.W. Riesmeier, L. Willmitzer, and W.B. Frommer. Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *The EMBO Journal*, 11(13) :4705–4713, 1992.
- P. Rinne, A. Saarelainen, and O. Junttila. Growth cessation and bud dormancy in relation to ABA level in seedlings and coppice shoots of *Betula pubescens* as affected by a short photoperiod, water stress and chilling. *Physiologia Plantarum*, 90(3) :451–458, 1994a.
- P. Rinne, H. Tuominen, and O. Junttila. Seasonal changes in bud dormancy in relation to bud morphology, water and starch content, and abscisic acid concentration in adult trees of *Betula pubescens*. *Tree Physiology*, 14(6) :549–561, June 1994b.

- C. Riou-Khamlichi, M. Menges, J.M.S. Healy, and J.A.H. Murray. Sugar control of the plant cell cycle : Differential regulation of arabidopsis D-type cyclin gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, 20(13) :4513–4521, 2000.
- A.G. Roberts, S.S. Cruz, I.M. Roberts, D.A.M. Prior, R. Turgeon, and K.J. Oparka. Phloem unloading in sink leaves of *Nicotiana benthamiana* : Comparison of a fluorescent solute with a fluorescent virus. *The Plant Cell*, 9(8) :1381–1396, 1997.
- G. Roblin, S. Sakr, J. Bonmort, and S. Delrot. Regulation of a plant plasma membrane sucrose transporter by phosphorylation. *FEBS Letters*, 424(3) :165–168, 1998.
- T. Roitsch, M. Bittner and D.E. Godt. Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by d-glucose and a glucose analog and tissue specific expression suggest a role in sink source regulation. *Plant Physiology*, 108 :285–294, 1995.
- M. Roldan, C. Gomez-Mena, L. Ruiz-Garcia, J. Salinas, and J.M. Martinez-Zapater. Sucrose availability on the aerial part of the plant promotes morphogenesis and flowering of *Arabidopsis* in the dark. *The Plant Journal*, 20(5) :581–590, 1999.
- R. Ruiz-Medrano, B. Xoconostle-Cazares, and W. J. Lucas. The phloem as a conduit for inter-organ communication. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(3) :202–209, 2001.
- G.J.A. Ryle. A quantitative analysis of the uptake of carbon and of the supply of ¹⁴C-labelled assimilates to areas of meristematic growth in *Lolium temulentum*. *Annals of Botany*, 36(3) : 497–512, 1972.
- S. Sabatier and D. Barthélémy. Bud structure in relation to shoot morphology and position on the vegetative annual shoots of *Juglans regia* l. (juglandaceae). *Annals of Botany*, 87(1) : 117–123, January 2001.
- S. Sabatier, D. Barthélémy, and I. Ducouso. Periods of organogenesis in mono- and bicyclic annual shoots of *Juglans regia* l. (Juglandaceae). *Annals of Botany*, 92(2) :231–238, 2003.
- T. Sachs and K.V. Thimann. Release of lateral buds from apical dominance. *Nature*, 201(4922) : 939–940, February 1964.
- M.H.Jr. Saier. Families of transmembrane sugar transport proteins. *Molecular Microbiology*, 35(4) :699–710, 2000a.
- M.H.Jr. Saier. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(2) :354–411, 2000b.
- N. Sauer. Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Letters Plant Transporters and Channels*, 581(12) :2309–2317, 2007.
- N. Sauer and J. Stolz. SUC1 and SUC2 : two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana* ; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. *The Plant Journal*, 6(1) :67–77, 1994.
- N. Sauer and W. Tanner. The hexose carrier from *Chorella*. cDNA cloning of a eucaryotic H⁺-cotransporteur. *FEBS Letters*, 259 :43–46, 1989.
- N. Sauer, K. Friedländer, and U. Gräml-Wicke Primary structure, genomic organization and heterologous expression of a glucose transporter from *Arabidopsis thaliana*. *The EMBO Journal*, 9(10) :3045–3050, 1990.

- N. Sauer, A. Ludwig, A. Knoblauch, P. Rothe, M. Gahrtz, and F. Klebl. AtSUC8 and AtSUC9 encode functional sucrose transporters, but the closely related AtSUC6 and AtSUC7 genes encode aberrant proteins in different Arabidopsis ecotypes. *The Plant Journal*, 40(1) :120–130, 2004.
- J.G. Schmalstig and D.J. Cosgrove. Coupling of solute transport and cell expansion in pea stems. *Plant Physiology*, 94(4) :1625–1633, 1990.
- J.G. Schmalstig and D.R. Geiger. Phloem unloading in developing leaves of sugar beet : I. evidence for pathway through the symplast. *Plant Physiology*, 79(1) :237–241, 1985.
- S. Schneider, A. Schneidereit, K.R. Konrad, M.-R. Hajirezaei, M. Gramann, R. Hedrich, and N. Sauer. Arabidopsis inositol transporter4 mediates high-affinity H⁺ symport of myoinositol across the plasma membrane. *Plant Physiology*, 141(2) :565–577, 2006.
- S. Schneider, A. Schneidereit, P. Udvardi, U. Hammes, M. Gramann, P. Dietrich, and N. Sauer. Arabidopsis inositol transporter2 mediates H⁺ symport of different inositol epimers and derivatives across the plasma membrane. *Plant Physiology*, 145(4) :1395–1407, 2007.
- A. Schneidereit, J. Scholz-Starke, and M. Buttner. Functional characterization and expression analyses of the glucose-specific AtSTP9 monosaccharide transporter in pollen of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 133(1) :182–190, 2003.
- A. Schneidereit, J. Scholz-Starke, N. Sauer, and M. Büttner. AtSTP11, a pollen tube-specific monosaccharide transporter in Arabidopsis. *Planta*, 221 :48–55, 2005.
- A. Schneidereit, A. Imlau, and N. Sauer. Conserved cis-regulatory elements for DNA-binding-with-one-finger and homeo-domain-leucine-zipper transcription factors regulate companion cell-specific expression of the Arabidopsis thaliana sucrose transporter 2 gene. *Planta*, 228 (4) :651–662, 2008.
- J. Scholz-Starke, M. Büttner, and N. Sauer. AtSTP6, a new pollen-specific H⁺-monosaccharide symporter from Arabidopsis. *Plant Physiology*, 131(1) :70–77, 2003.
- R. Shakya and A. Sturm. Characterization of source- and sink-specific sucrose/H⁺ symporters from carrot. *Plant Physiology*, 118(4) :1473–1480, 1998.
- J. Sheen, L. Zhou, and J.-C. Jang. Sugars as signaling molecules. *Current Opinion in Plant Biology*, 2(5) :410–418, 1999.
- S.M. Sherson, G. Hemmann, G. Wallace, S. Forbes, V. Germain, R. Stadler, N. Bechtold, N. Sauer, and S.M. Smith. Monosaccharide/proton symporter AtSTP1 plays a major role in uptake and response of Arabidopsis seeds and seedlings to sugars. *The Plant Journal*, 24 (6) :849–857, 2000.
- S. Shimizu-Sato, M. Tanaka, and H. Mori. Auxin-cytokinin interactions in the control of shoot branching. *Plant Molecular Biology*, 69(4) :429–435, 2009.
- A.B. Sivitz, A. Reinders, and J.M. Ward. Arabidopsis sucrose transporter AtSUC1 is important for pollen germination and sucrose-induced anthocyanin accumulation. *Plant Physiology*, 147(1) :92–100, 2008.
- K. Sorefan, J. Booker, K. HaurognÃ©, M. Goussot, K. Bainbridge, E. Foo, S. Chatfield, S. Ward, C. Beveridge, C. Rameau, and O. Leyser. MAX4 and RMS1 are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in Arabidopsis and pea. *Genes and Development*, 17(12) :1469–1474, 2003.

- R. Stadler and N. Sauer. The *Arabidopsis thaliana* AtSUC2 gene is specifically expressed in companion cells. *Botanica Acta*, 109(4) :299–306, 1996.
- R. Stadler, E. Truernit, M. Gahrtz, and N. Sauer. The AtSUC1 sucrose carrier may represent the osmotic driving force for anther dehiscence and pollen tube growth in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 19(3) :269–278, 1999.
- R. Stadler, M. Büttner, P. Ache, R. Hedrich, N. Ivashikina, M. Melzer, S.M. Shearson, S.M. Smith, and N. Sauer. Diurnal and light-regulated expression of AtSTP1 in guard cells of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 133(2) :528–537, 2003.
- P. Stirnberg, K. van de Sande, and H. M. O. Leyser. MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in *Arabidopsis*. *Development*, 129(5) :1131–1141, March 2002.
- A. Strum and G.Q. Tang. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *The Plant Journal*, 19(3) :269–278, 1999.
- A. Szenthe, H. SchÄpfel, J. Hauf, T. Schwend, and M. Wink. Characterisation and expression of monosaccharide transporters in lupins, *Lupinus polyphyllus* and *L. albus*. *Journal of Plant Research*, 120(6) :697–705, 2007.
- T. Takeda, K. Toyofuku, C. Matsukura, and J. Yamaguchi. Sugar transporters involved in flowering and grain development of rice. *Journal of Plant Physiology*, 158(4) :465–470, 2001.
- C. Tang, D. Huang, J. Yang, S. Liu, S. Sakr, H. Li, Y. Zhou, and Y. Qin. The sucrose transporter HbSUT3 plays an active role in sucrose loading to laticifer and rubber productivity in exploited trees of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *Plant, Cell and Environment*, 33(10) :1708–1720, 2010.
- M. Tegeder, X.-D. Wang, W.B. Frommer, C.E. Offler, and J.W. Patrick. Sucrose transport into developing seeds of *Pisum sativum* l. *The Plant Journal*, 18(2) :151–161, 1999.
- K. E. Thum, D. E. Shasha, L. V. Lejay, and G. M. Coruzzi. Light- and carbon-signaling pathways. modeling circuits of interactions. *Plant Physiology*, 132(2) :440–452, 2003.
- D. Toroser, Z. Plaut, and S.C. Huber. Regulation of a plant SNF1-related protein kinase by glucose-6-phosphate. *Plant Physiology*, 123(1) :403–412, 2000.
- K. Toyofuku, M. Kasahara, and J. Yamaguchi. Characterization and expression of monosaccharide transporters (OsMSTs) in rice. *Plant Cell Physiology*, 41(8) :940–947, 2000.
- Arabidopsis* SUGAR TPer. *Arabidopsis* sugar tper, 2010. URL http://www.biologie.uni-erlangen.de/mpp/TPer/index_TP.shtml.
- E. Truernit, J. Schmid, P. Epple, J. Illig, and N. Sauer. The sink-specific and stress-regulated *Arabidopsis* STP4 gene : Enhanced expression of a gene encoding a monosaccharide transporter by wounding, elicitors, and pathogen challenge. *Plant Cell*, 8(12) :2169–2182, 1996.
- E. Truernit, R. Stadler, K. Baier, and N. Sauer. A male gametophyte-specific monosaccharide transporter in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 17(2) :191–201, 1999.
- R. Turgeon. Phloem unloading in tobacco sink leaves : insensitivity to anoxia indicates a symplastic pathway. *Planta*, 171(1) :73–81, 1987.
- R. Turgeon. The sink-source transition in leaves. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40(1) :119–138, 1989.

- R. Turgeon. Phloem loading and plasmodesmata. *Trends in Plant Science*, 1(12) :418–423, 1996.
- R. Turgeon and S. Wolf. Phloem transport : Cellular pathways and molecular trafficking. *Annual Review of Plant Biology*, 60(1) :207–221, 2009.
- C.G.N. Turnbull, M.A.A. Raymond, I.C. Dodd, and S.E. Morris. Rapid increases in cytokinin concentration in lateral buds of chickpea (*Cicer arietinum* L.) during release of apical dominance. *Planta*, 202 :271–276, 1997.
- C.G.N. Turnbull, J.P. Booker, and H.M.O. Leyser. Micrografting techniques for testing long-distance signalling in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 32(2) :255–262, 2002.
- M. Umehara, A. Hanada, S. Yoshida, K. Akiyama, T. Arite, N. Takeda-Kamiya, H. Magome, Y. Kamiya, K. Shirasu, K. Yoneyama, J. Kyojuka, and S. Yamaguchi. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature*, 455(7210) :195–200, 2008.
- A.J.E. van Bel and P.H. Hess Hexoses as phloem transport sugars : the end of a dogma. *Journal of Experimental Botany*, 59(2) :261–272, 2008.
- A.J.E. van Bel. The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant, Cell & Environment*, 26(1) :125–149, 2003.
- J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, and F. Speleman. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7) :research0034.1 – research0034.11, 2002.
- M.W. Vaughn, G.N. Harrington, and D.R. Bush. Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16) :10876–10880, August 2002.
- C. Vieira Dos Santos, P. Delavault, P. Letousey, and P. Thalouarn. Identification by suppression subtractive hybridization and expression analysis of *Arabidopsis thaliana* putative defence genes during *Orobanche ramosa* infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62 (5) :297–303, 2003.
- C. Vignault, M. Vachaud, B. Cakir, D. Glissant, F. Dedaldechamp, M. Büttner, R. Atanassova, P. Fleurat-Lessard, R. Lemoine, and S. Delrot. VvHT1 encodes a monosaccharide transporter expressed in the conducting complex of the grape berry phloem. *Journal of Experimental Botany*, 56(415) :1409–1418, 2005.
- R. Viola, J. Pelloux, A. Van Der Ploeg, T. Gillespie, N. Marquis, A.G. Roberts, and R.D. Hancock. Symplastic connection is required for bud outgrowth following dormancy in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Plant, Cell and Environment*, 30(8) :973–983, 2007.
- H.X. Wang, R.R. Weerasinghe, T.D. Perdue, N.G. Cakmakci, J.P. Taylor, W.F. Marzluff, and A.M. Jones. A golgi-localized hexose transporter is involved in heterotrimeric G protein-mediated early development in *Arabidopsis*. *Molecular Biology of the Cell*, 17(10) :4257–4269, 2006.
- S.Y. Wang and M. Faust. Changes in membrane polar lipids associated with bud break in apple induced by nitroguanidines. *Journal of Plant Growth Regulation*, 8 :153–161, 1989a.

- S.Y. Wang and M. Faust. Nitroguanidines induce bud break and change sterol content in apple. *Journal of Plant Growth Regulation*, 8 :143–151, 1989b.
- S.Y. Wang and M. Faust. Changes of fatty acids and sterols in apple buds during bud break induced by a plant bioregulator, thidiazuron. *Physiologia Plantarum*, 72(1) :115–120, 1988.
- S.Y. Wang and M. Faust. Changes of inositol phosphates during decapitation-induced lateral bud break of *Malus domestica*. *Physiologia Plantarum*, 93(3) :471–475, 1995.
- Y. Wang and J. Li. Genes controlling plant architecture. *Current Opinion in Biotechnology Plant biotechnology / Food biotechnology*, 17(2) :123–129, 2006.
- Y. Wang, H. Xu, X. Wei, C. Chai, Y. Xiao, Y. Zhang, B. Chen, G. Xiao, P. Ouwkerk, M. Wang, and Z. Zhu. Molecular cloning and expression analysis of a monosaccharide transporter gene OsMST4 from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Molecular Biology*, 65(4) :439–451, 2007.
- Y. Wang, Y. Xiao, Y. Zhang, C. Chai, G. Wei, X. Wei, H. Xu, M. Wang, P. Ouwkerk, and Z. Zhu. Molecular cloning, functional characterization and expression analysis of a novel monosaccharide transporter gene OsMST6 from rice (*Oryza sativa* L.). *Planta*, 228 :525–535, 2008.
- A. Weber, J.C. Servaites, D.R. Geiger, H. Kofler, D. Hille, F. Groner, U. Hebbeker, and U.-I. Flugge. Identification, purification, and molecular cloning of a putative plastidic glucose translocator. *Plant Cell*, 12(5) :787–802, 2000.
- H. Weber, L. Borisjuk, U. Heim, N. Sauer, and U. Wobus. A role for sugar transporters during seed development : Molecular characterization of a hexose and a sucrose carrier in fava bean seeds. *Plant Cell*, 9(6) :895–908, 1997.
- A. Weig, J. Franz, N. Sauer, and E. Komor. Isolation of a family of cDNA clones from *Ricinus communis* L. with close homology to the hexose carriers. *Journal of Plant Physiology*, 143 : 178–183, 1994.
- A. Weise, L. Barker, C. Kühn, S. Lalonde, H. Buschmann, W.B. Frommer, and J.M. Ward. A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants. *Plant Cell*, 12(8) :1345–1356, 2000.
- W. Weschke, R. Panitz, N. Sauer, Q. Wang, B. Neubohn, H. Weber, and U. Wobus. Sucrose transport into barley seeds : molecular characterization of two transporters and implications for seed development and starch accumulation. *The Plant Journal*, 21(5) :455–467, 2000.
- W. Weschke, R. Panitz, S. Gubatz, Q. Wang, R. Radchuk, H. Weber, and U. Wobus. The role of invertases and hexose transporters in controlling sugar ratios in maternal and filial tissues of barley caryopses during early development. *The Plant Journal*, 33(2) :395–411, 2003.
- J. White. The plant as a metapopulation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 10(1) : 109–145, 1979.
- S.-A. Whiteman, L. Serazetdinova, A.M.E. Jones, D. Sanders, J. Rathjen, S.C. Peck, and F.J.M. Maathuis. Identification of novel proteins and phosphorylation sites in a tonoplast enriched membrane fraction of *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics*, 8(17) :3536–3547, 2008.
- L.E. Williams, R. Lemoine, and N. Sauer. Sugar transporters in higher plants - a diversity of roles and complex regulation. *Trends in Plant Science*, 5(7) :283–290, 2000.

- A. Wormit, O. Trentmann, I. Feifer, C. Lohr, J. Tjaden, S. Meyer, U. Schmidt, E. Martinoia, and H.E. Neuhaus. Molecular identification and physiological characterization of a novel monosaccharide transporter from *Arabidopsis* involved in vacuolar sugar transport. *Plant Cell*, 18(12) :3476–3490, 2006.
- D.P. Wright, J.D. Scholes, D.J. Read, and S.A. Rolfe. European and african maize cultivars differ in their physiological and molecular responses to mycorrhizal infection. *New Phytologist*, 167(3) :881–896, 2005.
- K. M. Wright and K. J. Oparka. The fluorescent probe hpts as a phloem-mobile, symplastic tracer : an evaluation using confocal laser scanning microscopy. *Journal of Experimental Botany*, 47(3) :439–445, 1996.
- K.M. Wright, A.G. Roberts, H.J. Martens, N. Sauer, and K.J. Oparka. Structural and functional vein maturation in developing tobacco leaves in relation to AtSUC2 promoter activity. *Plant Physiology*, 131(4) :1555–1565, 2003.
- S. Wu, N. Watanabe, S. Mita, H. Dohra, Y. Ueda, M. Shibuya, and Y. Ebizuka. The key role of phloroglucinol o-methyltransferase in the biosynthesis of *Rosa chinensis* volatile 1,3,5-trimethoxybenzene. *Plant Physiology*, 135(1) :95–102, 2004.
- W. Xiao, J. Sheen, and J.-C. Jang. The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Molecular Biology*, 44 :451–461, 2000.
- Z. Yan, O. Dolstra, T. Hendriks, T. Prins, P. Stam, and P. Visser. Vigour evaluation for genetics and breeding in rose. *Euphytica*, 145 :339–347, 2005.
- J. Yang, D. Huang, S. Liu, and C. Tang. Molecular cloning and sequence analysis of six sucrose transporter genes from *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *Re Dai Zuo Wu Xue Bao*, 28 : 32–38, 2007.
- M. Yuanyuan, Z. Yali, L. Jiang and S. Hongbo Roles of plant soluble sugars and their responses to plant cold stress. *African Journal of Biotechnology*, 8(10) :2004–2010, 2009.
- Y. Zhang, L.F. Primavesi, D. Jhurrea, P.J. Andralojc, R.A.C. Mitchell, S.J. Powers, H. Schluepmann, T. Delatte, A. Wingler, and M.J. Paul. Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. *Plant Physiology*, 149 (4) :1860–1871, 2009.
- Y. Zhang, Z. Liu, L. Wang, S. Zheng, J. Xie, and Y. Bi. Sucrose-induced hypocotyl elongation of *Arabidopsis* seedlings in darkness depends on the presence of gibberellins. *Journal of Plant Physiology*, 167(14) :1130–1136, 2010.
- Y. Zhou, H. Qu, K.E. Dibley, C.E. Offler, and J.W. Patrick. A suite of sucrose transporters expressed in coats of developing legume seeds includes novel pH-independent facilitators. *The Plant Journal*, 49(4) :750–764, 2007.
- N. Zieslin and A.H. Halevy. Components of axillary bud inhibition in rose plants. i. The effect of different plant parts (correlative inhibition). *Botanical Gazette*, 137(4) :291–296, 1976a.
- N. Zieslin and A.H. Halevy. Components of axillary bud inhibition in rose plants. ii. The effect of bud position on degree of inhibition. *Botanical Gazette*, 137(4) :297–300, 1976b.
- M.H. Zimmermann and H. Ziegler. *Transport in Plants : Phloem Transport (Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 1)*, List of sugars and sugar alcohols in sieve-tube exudates, pages 480–503. Springer, 1975.

Annexe A

Composition du milieu de Murashige & Skoog modifié

Milieu de Murashige & Skoog modifié utilisé an culture *in vitro*

Milieu MS modifié	Quantité pour 1 L
Macroéléments 10X	100 mL
Microéléments 1000X	1 mL
Vitamine 100X	10 mL
Na-Fe-EDTA	10 mL
Myo-inositol	100 mg
Glycine	200 mg
Glutamine	200 mg
Acide Ascorbique	100 mg
Agar Aubigel G3	8 g
Sucres	quantité variable
Eau distillée	Ajouter à 800 mL, ajuster le pH à 5,8 et compléter à 1 L

Autoclaver la solution 20 min à 120°C, puis ajouter 0,2% (volume/volume) de PPM (Plant Preservative Mixture, Kalys, France), soit 2 mL / L de milieu. Homogénéiser et couler le milieu dans les boites de culture. Conserver à 4°C.

Macroéléments 10X	Quantité pour 1 L
Nitrate d'ammonium (NH_4NO_3)	16,5 g
Nitrate de potassium (KNO_3)	19 g
Chlorure de potassium ($\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$)	4,4 g
Sulfate de magnésium ($\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$)	3,7 g
Phosphate de potassium (KH_2PO_4)	1,7 g

Microéléments 1000X	Quantité pour 100 mL
Acide borique (H_3BO_3)	620 mg
Sulfate de manganèse ($\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$)	1,69 g
Sulfate de zinc ($\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$)	1,06 g
Iodure de potassium (KI)	83 mg
Molybdate de sodium ($\text{Na}_2\text{MoO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$)	25 mg
Sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$)	2,5 mg
Chlorure de cobalt ($\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$)	2,5 mg

Vitamines 100X	Quantité pour 1 L
Acide nicotinique	50 mg
Pyridoxine hydrochloride	50 mg
Thiamine hydrochloride	50 mg
Pantothénate de calcium	50 mg
Chlorydrate de L-cystéine	50 mg
Biotine	0,5 mg

Na-Fe-EDTA	Quantité pour 1 L
Sulfate de fer ($\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$)	2,78 g
Na_2 EDTA	3,73 g

Annexe B

Tampon d'extraction des sucres

Tampon de broyage utilisé pour le dosage des sucres dans les tissus de rosier

Tampon de broyage	Quantité pour 10 mL	Concentration finale
DTT	20 µL	2,6 mM
Éthylène glycol	1 mL	10%
Triton 100 X à 2%	100 µL	0,02%
Tampon E	9 mL	
	Ajuster à pH 7	

Tampon E	Quantité pour 100 mL	Concentration finale
Hepes	1,19 g	50 mM
Chlorure de magnésium (MgCl ₂) 1 M	1 mL	10 mM
EDTA, 2Na	37 mg	1 mM
	Ajuster à pH 7	

Chlorure de magnésium (MgCl₂)	Quantité pour 100 mL	Concentration finale
Chlorure de magnésium (MgCl ₂)	9,52 g	1 M

Annexe C

Transcription inverse

Protocole de transcription inverse

Préparer le mélange 1

Mélange 1	1 X	Concentration finale
dNTP (10 mM)	1 µl	0,5 mM
OligodT(20) (25 mM)	1 µl	1,25 mM
ARN (1 µg)		50 ng / µL
Eau traitée au DEPC	Compléter à 13 µl	

Mélanger, centrifuger brièvement, incuber **5 min à 65°C** pour dénaturer les acides nucléiques et placer immédiatement dans la glace (2 min)

Centrifuger brièvement et ajouter 7 µL du mélange 2 au mélange précédent :

Mélange 2	1 X	Concentration finale
5 X First-Strand Buffer	4 µl	1 X
DTT (100 mM)	1 µl	5 mM
SSIII Reverse Transcriptase (200U / µL)	1 µl	10 U / µL
Rnasin® Plus Rnase Inhibitor (1U / µL)	1 µl	0,05 U / µL
Volume final	20 µl	

Mélanger, centrifuger brièvement et incuber **2 h à 47°C** pour synthétiser les ADN complémentaires des ARN messagers

Incuber **5 min à 95°C** pour arrêter la réaction

Annexe D

Conditions d'amplification pour les PCR semi-quantitatives

Protocole de PCR semi quantitative

Préparer le mélange de PCR pour le nombre d'échantillons testés :

Mélange pour 1 échantillon	1 X	Concentration finale
5 X Green GoTaq® Flexi Buffer	5 µL	1 X
MgCl ₂ (25 mM)	1,6 µL	1,6 mM
dNTP (10 mM)	0,5 µL	0,2 mM
Amorce sens (10 µM)	0,75 µL	0,3 µM
Amorce antisens (10 µM)	0,75 µL	0,3 µM
GoTaq® DNA polymerase (5U / µL)	0,1 µL	0,02 U / µL
Eau traitée au DEPC	11,3 µL	
Volume total	20 µL	

Homogénéiser le mélange, centrifuger brièvement et répartir 20 µL du mélange dans les tubes à PCR

Ajouter 5 µL d'ADNc purifiés et dilués au 1/400ème ou d'eau (témoin négatif) au mélange

Homogénéiser le tout par quelques allers-retours à la pipette, centrifuger brièvement et placer dans le thermocycleur

Réaliser la réaction de PCR selon le programme d'amplification suivant :

Préchauffage couvercle 5 min à 105 °C

Etape 1 :	1 cycle	
94 °C	5 min	dénaturation initiale
Etape 2 :	X cycles	
94 °C	0 min 30	dénaturation
Y °C	0 min 45	hybridation
72 °C	Z min	élongation
Etape 2 :	1 cycles	
72 °C	5 min	élongation finale

X = nombre de cycles d'amplification

Y = température d'hybridation (T_a)

Z = temps d'élongation

Les valeurs de X, Y et Z sont fournies avec l'annexe présentant les différents couples d'amorces

Annexe E

Amorces de PCR semi-quantitative et quantitative

Couples d'amorces utilisés pour les réactions de RT-PCR semi quantitative et quantitative

Gène	Nom des amorces	Séquence des amorces	Taille de l'amplicon (pb)	Efficacité	Application RT-PCR	Condition utilisées pour la PCR semi-quantitative			
						Nombre de cycles (X)	Température d'hybridation (Y)	Temps d'élongation (Z)	Pourcentage du gel d'agarose
<i>RhSUC1</i>	USUT2Rhq1	CGGCTGGATCGCTAAACGTT	81	--	SQ	37	59	30 s	3
	LSUT2Rhq2	TGAGGTTGGCGCAGTAAATGTC							
<i>RhSUC2</i>	USUT2-2Rh1	CTACACCCACCTCCACAAGATG	241	--	SQ	35	57	30 s	2
	LSUT2-2Rh2	ACCAAGGATCTCGCTGAAGA							
	USUT2-2Rhq3	GGTCCTACACCCACCTCCACAA	81	1,002	Q	--	--	--	--
	LSUT2-2Rhq4	AGGTTTTGAGATTGGCGCAGTAGA							
<i>RhSUC3</i>	USUT3Rhq1	AGACCGACTCGGTGTCGATTC	81	0,955	SQ et Q	35	59	30s	3
	LSUT3Rhq2	GCTCATCATCCATCCCCATCA							
<i>RhSUC4</i>	USUT4Rhq1	TTGGCAATATTCTTGGCTATGCAA	81	0,984	SQ et Q	37	61	30s	3
	LSUT4Rhq2	CGCACGCGGAGGTAAGTGTA							
<i>RhSTP1</i>	USTP1Rhq1	GTTTGAGTTTGGGTGGTGAATG	135	1,012	SQ et Q	33	57	30 s	2,5
	LSTP1Rhq2	CGCGAATTCTCCGGAGATGG							
<i>RhSTP9</i>	USTP9Rhq1	TTGTTCTTGAAGGTGGAGTGCAA	81	0,859	SQ et Q	37	57	30s	3
	LSTP9Rhq2	GCTCACACTGAACCTTCATCCCTACCA							
<i>RhTMT2</i>	UTMT2Rhq3	AGGGAATCAACCCAGGCTCTAAG	81	1,155	SQ et Q	37	61	30s	3
	LTMT2Rhq4	CCTGCATCGGATGCATAGTCA							
<i>RhSAND1</i>	USAND1Rhq1	TCTCCTCATTTGAACCAACACACA	81	1,099	SQ et Q	37	59	30 s	3
	LSAND1Rhq2	AGGGCCACCTACGCCATCAT							
<i>RhGAPDH</i>	eA01A	ATCCATTCATACCACCGACTACA	285	--	SQ	27	55	1 min	2
	eA01B	GCATCCTTACTTGGGGCAGAGA							
	LGAPDHROq.5	GGTGGTGCCAAGAAGGTTGTCATCT	81	0,888	Q	--	--	--	--
	UGAPDHROq.6	GTATTCATGCTCATTGACTCCCACAACA							
<i>RhEF1alpha</i>	UEFROq.1	TCGTTTTGCTGTGAGGGACATG	81	0,885	Q	--	--	--	--
	LEFROq.2	TTGGTCACCTTGGCACCAGAT							
<i>RhTubulin1</i>	qtubulose S1	GCATGATCTCCAACCTCCACCAG	Environ 100	1,000	Q	--	--	--	--
	qtubulose AS1	GACTCGGCACCAACCTCCTC							

Annexe F

Amorces dégénérées pour le clonage des transporteurs de sucre

Couples d'amorces dégénérées utilisés pour les clonages des séquences d'ADNc partielles de transporteurs de saccharose

Nom des amorces	Séquence des amorces	Gène(s) ciblé(s)	Taille attendue (pb)	Gène amplifié	Taille obtenue (pb)	Nombre de cycles (X)	Température d'hybridation (Y)	Temps d'élongation (Z)
RhSUT2F1	CNT TYT TYA TGG CSG TBG G	<i>RhSUCs</i>	~ 400	<i>RhSUC1</i>	367	35	55°C	1 min 30
RhSUT2R1	TCW YKV CCC ATC CAR TCD GT			<i>RhSUC4</i>	397			
RhSUT2F1	CNT TYT TYA TGG CSG TBG G	<i>RhSUCs</i>	~ 400	<i>RhSUC4</i>	380	40	54°C	1 min 30
RhSUT2R2	GGR AAC CAN GCD ATC CAR T							
RhSUT2F2	TWY GRY ACH GAY TGG ATG GG	<i>RhSUCs</i>	~ 1200	--	smear	35	45°C	1 min 30
OligodT(20)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT							
RhSUT2F3	CTR ACY CCN TAY GTH CAR CT	<i>RhSUC2</i>	~ 800	<i>RhSUC2</i>	755	40	54°C	1 min 30
RhSUT2R2	GGR AAC CAN GCD ATC CAR T							
RhSUT2F4	CTM ATY GGH TWY GCN GCB GA	<i>RhSUC2</i>	~ 600	--	--	40	56°C	1 min 30
RhSUT2R2	GGR AAC CAN GCD ATC CAR T							
RhSUT3F1	GAA GGA TAC GGA AGT TGA	<i>RhSUC3</i>	~ 1200	--	--	35	48°C	1 min 30
RhSUT3R1	NCC CAT CCA ATC NGT RTC							
RhSUT3F1	GAA GGA TAC GGA AGT TGA	<i>RhSUC3</i>	~ 600	--	plusieurs bandes	35	48°C	1 min 30
RhSUT3R2	ATC WGC YAR RAG DGC WCG							

Bases correspondantes aux lettres indiquant les dégénérescences :

M	R	W	S	Y	K	V	H	D	B	N
AC	AG	AT	GC	CT	GT	AGC	ACT	AGT	GCT	AGCT

Couples d'amorces dégénérées utilisés pour les clonages des séquences d'ADNc partielles de transporteurs d'hexoses

Nom des amorces	Séquence des amorces	Gènes ciblés	Taille attendue (pb)	Gène amplifié	Taille obtenue (pb)	Nombre de cycles (X)	Température d'hybridation (Y)	Temps d'élongation (Z)
RhHEX1F1	GCC ATG GGY GGY YTS ATC TTY GG	<i>RhSTP1 et 12</i>	~ 1300	--	smear	40	52 à 64°C	2 min
RhHEX1R1	AAC TTC AWR TGR CAA AGC AT							
RhHEX1F2	CCR TAY AAR TAC AGA GGA GC	<i>RhSTP1 et 12</i>	~ 450	<i>RhSTP1</i>	443	40	50 à 56°C	1 min
RhHEX1R2	AAC ARM ACM GGM GCR TAR AAC AT							
RhHEX2F1	ATS TTY GGT TAC GAC RTC GG	<i>RhSTP2, 6, 8 et 13</i>	~ 800	--	rien	40	50 à 60°C	2 min
RhHEX2R1	TAG AAC ATA AYC RCR TTG AT							
RhHEX2F2	CCD YTK TTC HTV TCD GAG ATT	<i>RhSTP2, 6, 8 et 13</i>	~ 450	--	rien	40	45 à 55°C	2 min
RhHEX2R1	TAG AAC ATA AYC RCR TTG AT							
RhHEX2F3	GGN GGT CTC ATG TTY GGN TA	<i>RhSTP2, 6, 8 et 13</i>	~ 400	--	plusieurs bandes	40	53 à 63°C	2 min
RhHEX2R2	GAA YAA WGG MAC NGY CTG GTT							
RhHEX3F1	ATG GCK GSC ATG GGM GGW GTC AT	<i>RhSTP3</i>	~ 1300	--	rien	40	49 à 59 °C	2 min
RhHEX3R1	CCA WAA AAG AAG AAA ATY CCA G							
RhHEX3F1	ATG GCK GSC ATG GGM GGW GTC AT	<i>RhSTP3</i>	~ 400	--	rien	40	59 à 69°C	2 min
RhHEX3R2	CCR TTG YTG ATT GCY CCT CTR TAT YTT G							
RhHEX4F1	TAY GAY MTY GGN ATC TCA GG	<i>RhSTP4, 9, 10 et 11</i>	~ 1300	--	rien	40	51 à 61°C	2 min
RhHEX4R1	GTC TCM GGC AAC AWN AAG TAR ATG AA							
RhHEX4F1	TAY GAY MTY GGN ATC TCA GG	<i>RhSTP4, 9, 10 et 11</i>	~ 400	--	rien	40	45 à 55°C	2 min
RhHEX4R2	AAM CCR WTG TTD ARW GCT CCT C							
RhHEX5F1	CTC ATT TTT GGS TAT GAC ATC GGA AT	<i>RhSTP5</i>	~ 1400	--	rien	40	46 à 56°C	2 min
RhHEX5R1	TCT CCC AMA CTT GAT ACA T							
RhHEX5F1	CTC ATT TTT GGS TAT GAC ATC GGA AT	<i>RhSTP5</i>	~ 350	<i>RhSTP5</i>	350	40	55 à 65°C	2 min
RhHEXR2	TGG TTN GTG AAA CCN ACA CCA AAT CC							
RhHEX6-8F1	ACA ATH GGN ATC YTN ATT GC	<i>RhSTP6 et 8</i>	~ 360	--	rien	40	48 à 58°C	2 min
RhHEX6-8R1	ACN GGN GCR TAR AAC ATD AT							
RhHEX7F1	TCA GGA GGM GTK AYM TCR ATG GAT	<i>RhSTP7</i>	~ 1300	--	~ 600	40	50 à 60°C	2 min
RhHEX7R1	GGA ACT CCY TTK GTT TCA GG							
RhHEX7F2	ATC AAR CAT CCH TTC AGA AAC AT	<i>RhSTP7</i>	~ 630	--	smear	40	45 à 55°C	2 min
RhHEX7R1	GGA ACT CCY TTK GTT TCA GG							
RhHEX7F3	AGG TGG GGT TAC ATC AAT GGA T	<i>RhSTP7</i>	~ 400	<i>RhSTP7</i>	401	40	45 à 55°C	2 min
RhHEX7R2	TTG TTG CTA ACT GAA ACA TCA TGT T							
RhHEX9F1	TTY GCW TGG TCM TGG GGN CC	<i>RhSTP9</i>	~ 350	<i>RhSTP9</i>	355	40	42 °C	2 min
RhHEX9R1	GGT WTG AAS WBA SYT GKT CGT A							
RhHEX13F1	GCN ACC GGC GGC CTC ATG TT	<i>RhSTP13</i>	~ 400	<i>RhSTP13</i>	407	40	55 à 65°C	2 min
RhHEX13R1	ATY CTN GTA GGT GCA ATC TCC GA							

Annexe G

Conditions d'amplification pour les PCR sur PCR

Protocole d'amplification des ADNc partiels de transporteurs de sucres

Préparer le mélange de PCR pour le nombre d'échantillons testés :

Mélange pour 1 échantillon	1 X	Concentration finale
5 X Colorless GoTaq® Flexi Buffer	6 µL	1 X
MgCl ₂ (25 mM)	2 µL	1,6 mM
dNTP (10 mM)	0,6 µL	0,2 mM
Amorce sens (10 µM)	1 µL	0,3 µM
Amorce antisens (10 µM)	1 µL	0,3 µM
GoTaq® DNA polymerase (5U/µL)	0,1 µL	0,016 U / µL
Eau traitée au DEPC	14,3 µL	
Volume total	25 µL	

Homogénéiser le mélange, centrifuger brièvement et répartir 25 µL du mélange dans les tubes à PCR

Ajouter 5 µL d'ADNc purifiés et dilués au 1/400ème ou d'eau (témoin négatif) au mélange

Homogénéiser le tout par quelques allers-retours à la pipette, centrifuger brièvement et placer dans le thermocycleur

Réaliser la réaction de PCR selon le programme d'amplification suivant :

Préchauffage couvercle 5 min à 105 °C

Etape 1 :	1 cycle	
94 °C	5 min	dénaturation initiale
Etape 2 :	X cycles	
94 °C	0 min 30	dénaturation
Y °C	0 min 45	hybridation
72 °C	Z min	élongation
Etape 2 :	1 cycles	
72 °C	5 min	élongation finale

X = nombre de cycles d'amplification

Y = température d'hybridation (T_a)

Z = temps d'élongation

Les valeurs de X, Y et Z sont fournies dans les annexes présentant les couples d'amorces dégénérées utilisées pour les clonages

Réaliser une seconde PCR à partir de 5 µL de produit de la première PCR en conservant les mêmes conditions d'amplification

Annexe H

Transformation bactérienne

Protocole de transformation de bactéries

Décongeler les ***E. Coli JM109*** compétentes dans la glace

Ajouter **100 µL de bactéries compétentes** au mélange de ligation (5 à 10 µL)

Homogénéiser délicatement en tapotant le tube et incuber **30 min à 4°C** dans la glace

Faire subir un choc thermique aux cellules en les incubant **45 s à 42 °C** à l'aide d'un bain marie et les transférer immédiatement dans la glace. Cette étape permet de faire pénétrer les produits de ligation dans les cellules dont la membrane est fragilisée pendant un court instant

Attendre 2 min et ajouter **900 µL de SOC** aux cellules transformées

Incuber **1 à 2 h à 37 °C** avec une agitation de 180 rpm

Étaler **200 µL** de suspension cellulaire non concentrée ou concentrée sur milieu de sélection. Les cellules sont concentrées par centrifugation 2 min à 3000 rpm et reprise dans 200 µL de SOC

Milieu SOC	Quantité pour 100 mL
Bactotryptone	2 g
Extrait de levure	500 mg
Chlorure de sodium (NaCl)	50 mg
Chlorure de potassium (KCl, 250 mM)	1 mL
Chlorure de magnésium (MgCl, 10 mM)	500 µL
D-Glucose (20 mM)	2 mL

Stériliser par filtration à l'aide d'une membrane (pores de 0,22 µm) et d'une seringue. Conserver à -20 °C

Milieus de sélection :

LB solide + ampicilline (50 µg/mL) + IPTG (0,5 mM) + X-Gal (50 µg/mL) pour les transformations avec le vecteur pGEM®T-easy

LB solide + ampicilline (50 µg/mL) pour les transformations avec le vecteur pDR296

Milieu LB solide	Quantité pour 1 L
Bactotryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
Chlorure de sodium (NaCl)	5 g
Agar	15 g

Ajuster le pH à 7 et stériliser par autoclavage. Ajouter l'ampicilline, l'IPTG et le X-Gal, couler dans des boîtes de Pétri et conserver à 4°C et à l'abri de la lumière.

Annexe I

Conditions d'amplification pour les PCR sur bactéries

Protocole de PCR sur colonie bactérienne

Préparer le mélange de PCR pour le nombre d'échantillons testés :

Mélange pour 1 échantillon	1 X	Concentration finale
5 X Green GoTaq® Flexi Buffer	8 µL	1 X
MgCl ₂ (25 mM)	2,6 µL	1,6 mM
dNTP (10 mM)	0,8 µL	0,2 mM
Amorce sens (10 µM)	1,5 µL	0,4 µM
Amorce antisens (10 µM)	1,5 µL	0,4 µM
GoTaq® DNA polymerase (5U/µL)	0,2 µL	0,025 U / µL
Eau traitée au DEPC	25,4 µL	
Volume total	40 µL	

Homogénéiser le mélange, centrifuger brièvement et répartir 40 µL du mélange dans les tubes à PCR

Piquer la colonie à tester avec un cône de 200 µL stérile. La repiquer sur milieu de sélection et mettre le cône dans le mélange de PCR

Homogénéiser le tout par quelques allers-retours à la pipette, centrifuger brièvement et placer dans le thermocycleur

Réaliser la réaction de PCR selon le programme d'amplification suivant :

Préchauffage couvercle 5 min à 105 °C

Etape 1 :	1 cycle	
94 °C	5 min	dénaturation initiale
Etape 2 :	X cycles	
94 °C	0 min 30	dénaturation
Y °C	0 min 45	hybridation
72 °C	1 à 3 min	élongation
Etape 2 :	1 cycles	
72 °C	5 min	élongation finale

X = nombre de cycles d'amplification

Y = température d'hybridation (T_a)

Z = temps d'élongation

Les valeurs de X, Y et Z sont fournies dans l'annexe présentant les différents couples d'amorces utilisés pour la PCR semi quantitative

Couples d'amorces utilisés pour les criblages :

Nom des amorces	Séquence des amorces	Vecteur d'expression	Nombre de cycles (X)	Température d'hybridation (Y)
pUC1	GTT TTC CCA GTC ACG AC	pGEM®T-easy	35	55°C
pUC2	CAG GAA ACA GCT ATG AC			
PMA1-F	TCT TTC CTA TAA CAA CAA TAG	pDR296	40	46°C
ADH1-R	TGG AGA CTT GAC CAA ACC			

Les amplifications sur les vecteurs vides donnent des fragments d'environ 300 pb.

Annexe J

Conditions d'amplification pour les RACE

Protocole de RACE (Rapid Amplification of CDNA Ends)

Préparer le mélange de PCR pour le nombre d'échantillons testés :

Mélange pour 1 échantillon	1 X	Concentration finale
Eau traitée au DEPC	36 µL	
10 X Advantage® 2 PCR Buffer	5 µL	1 X
dNTP (10 mM)	1 µL	0,2 mM
50 X Advantage® 2 Polymerase Mix	1 µL	1 X
Volume total	43 µL	

Homogénéiser le mélange, centrifuger brièvement et répartir 43 µL du mélange dans les tubes à PCR

Ajouter 1 µL d'amorce AP1 (0,2 µM final), 1 µL d'amorce sens ou antisens spécifique du gène amplifié (0,2 µM final) et 5 µL de la banque ADNc avec adaptateurs diluée au 1/250^{ème} dans du tampon tricine-EDTA

Homogénéiser le tout par quelques allers-retours à la pipette, centrifuger brièvement et placer dans le thermocycleur

Réaliser la réaction de PCR selon le programme d'amplification suivant :

Préchauffage couvercle 5 min à 105 °C

Etape 1 :	1 cycle	
94 °C	1 min	dénaturation initiale
Etape 2 :	5 cycles	
94 °C	30 s	dénaturation
72 °C	4 min	hybridation et élongation
Etape 2 :	5 cycles	
94 °C	30 s	dénaturation
70 °C	4 min	hybridation et élongation
Etape 2 :	30 cycles	
94 °C	20 s	dénaturation
72 °C	4 min	hybridation et élongation

Couples d'amorces utilisés pour les clonages :

Nom des amorces	Séquence des amorces	Fragment amplifié
AP1	CCA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC	Extrémité 5' de RhSUC2
RhSUC2R1	GGA TAC GAG AGC GAG AAT GGT GAG GGC	
RhSUC2F1	CCA TCT TCG TGG TCG GGT TCT GGA T	Extrémité 3' de RhSUC2
AP1	CCA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC	

Annexe K

Conditions d'amplification pour la PCR quantitative en temps réel

Protocole de PCR quantitative en temps réel

Préparer le mélange de PCR pour le nombre d'échantillons testés :

Mélange pour 1 échantillon	1 X	Concentration finale
Eau traitée au DEPC	6 µL	
Amorce sens (10 µM)	0,75 µL	0,3 µM
Amorce antisens (10 µM)	0,75 µL	0,3 µM
2X iQ™ SYBR® Green Supermix	12,5 µL	1 X
Volume total	20 µL	

Homogénéiser le mélange, centrifuger brièvement et répartir 20 µL du mélange dans les puits de la plaque à PCR

Ajouter 5 µL d'ADNc purifiés et dilués au 1/400ème ou d'eau (témoin négatif) au mélange

Homogénéiser le tout par quelques allers-retours à la pipette, sceller la plaque et placer dans le thermocycleur

Réaliser la réaction de PCR selon le programme d'amplification suivant :

Préchauffage couvercle 5 min à 105 °C

Etape 1 :	1 cycle	
50°C	2 min	préchauffage
Etape 2 :	1 cycle	
95°C	3 min	activation de la Taq Polymérase
Etape 3 :	40 cycles	
95 °C	15 s	dénaturation
60 °C	1 min	hybridation et élongation

Mesure de fluorescence émise par les échantillons

Etape 2 :	1 cycle	
50 à 98°C	--	courbes de fusion

Annexe L

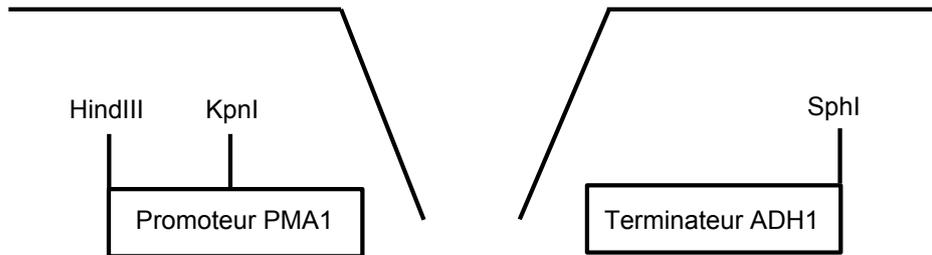
Le vecteur d'expression en levure pDR296

Carte de restriction du vecteur d'expression en levure pDR296

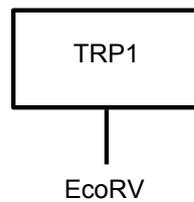
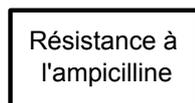
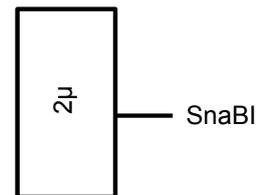
(Doris Rentsch, Université de Bern, Suisse)

Site Multiple de Clonage (SMC)

SpeI, BamHI*, **SmaI**, **PstI**, **EcoRI**, EcoRV, HindIII, **Sall**, **XhoI**, Acc65I, KpnI, BamHI*



Vecteur pDR296 ~ 6300 pb



Remarques :

* indique que l'enzyme coupe 2 fois dans le SMC

Les sites de restriction indiqués en gras ne sont présents qu'une fois dans le vecteur

Annexe M

Transformation de levures

Protocole de transformation de levures

Ajouter **5 µL d'ADN de sperme de saumon**, **5 µL d'histamine** et **2,5 µg d'ADN plasmidique** aux levures ***S. cerevisiae* SUSY7 compétentes** encore congelées

Incubation **5 min à 37 °C** sous agitation pour les décongeler

Ajouter **1 mL de solution B** et mélanger par inversion

Incuber **1 h à 28 °C** en agitant régulièrement

Centrifuger **3 min à 3000 g** et laver le culot avec **500 µl de solution C**

Centrifuger **3 min à 3000 g** et suspendre le culot dans **200 µl de solution C**

Homogénéiser par quelques aller-retour à la pipette et étaler **50 µL de levures** sur le milieu sélectif

Solution B	Quantité pour 50 mL	Concentration finale
Bicine (0,5 M, pH 8,35)	20 mL	200 mM
PEG 1000	20 g	40%

Solution C	Quantité pour 50 mL	Concentration finale
Bicine (0,5 M, pH 8,35)	1 mL	10 mM
Chlorure de sodium (NaCl, 5 M)	1,5 mL	150 mM

Stériliser par filtration à l'aide d'une membrane (pores de 0,22 µm) et d'une seringue. Conserver à température ambiante

Milieu de sélection :

Milieu YNB + glucose 2 %	Pour 1L	Concentration finale
Yeast Nitrogen Base (YNB)	1,7 g	0,17%
Sulfate d'ammonium ((NH ₄) ₂ SO ₄)	5 g	40 mM
D-Glucose	20 g	110 mM

Annexe N

Caractérisation fonctionnelle de *RhSUC2*

Protocole d'absorption de saccharose radiomarqué par les levures

La veille de la manipulation, cultiver les levures transformées dans **20 à 25 mL** de milieu **YNB + glucose 2%** liquide, à **28 °C et 200 rpm** d'agitation de façon à obtenir une $DO_{600\text{ nm}} = 0.6-0.8$ le lendemain matin

Le lendemain, mesurer la $DO_{600\text{ nm}}$, lorsqu'elle est comprise entre **0.6 et 0.8**, centrifuger les cellules **5 min à 2000 g**

Effectuer **2 lavages** des cellules par ajout d'un volume d'eau filtrée (20 ou 25 mL) suivis d'une centrifugation **5 min à 2000 g**

Enlever l'excédent d'eau par une centrifugation des cellules **5 min à 2000 g** dans un tube de 2 mL

Reprendre les cellules dans 3 mL de milieu **MES (50 mM, pH 4.5)** (ou dans de l'eau pour déterminer le pH optimum)

Mesurer la DO de la culture (en diluant les échantillons au 1/10^{ème}) et ajuster le volume de culture pour obtenir une $DO_{600\text{ mM}} (1/10^{\text{ème}}) = 0.3$

Placer les tubes dans la glace pour inhiber le développement des cellules

Homogénéiser les cellules à l'aide d'un vortex

Ajouter **100 µL de cellules à 100 µL de solution d'incubation (SI)**, homogénéiser au vortex et incubé **2 min à 28 °C** (ou 1, 2, 5 et 10 min pour la cinétique d'absorption dans le temps)

Arrêter l'absorption par ajout de **4 mL d'eau glacée** et récupérer les cellules par **filtration** sur feuille de papier de verre à l'aide d'une pompe à vide

Recommencer l'opération pour bien rincer le tube et placer le filtre dans un tube à scintillation de 5 mL

Laisser **sécher** les filtres **30 min** à température ambiante

Ajouter **4 mL de liquide à scintillation** et incubé **30 min**

Homogénéiser au vortex (environ 5 s / tube)

Placer dans le compteur à scintillation et lancer le programme de comptage

Effectuer un **dosage de protéines** sur les cellules utilisées pour réaliser la manipulation (voir protocole à la suite)

Solutions d'incubation :

Caractérisation de la cinétique d'absorption dans le temps

Saccharose (1 mM) + [U-14C] saccharose (0,5 µCi/mL ; 18,43 GBq/mmol) dans du tampon MES (50 mM ; pH 4.5)

Caractérisation du pH optimal d'absorption

Saccharose (5 mM) + [U-14C] saccharose (0,5 µCi/mL ; 18,43 GBq/mmol) dans du tampon MES (100 mM ; pH 4, 4.5, 5, 6 ou 7)

Caractérisation de la cinétique d'absorption dans le temps

Saccharose (0.2, 0.5, 1, 2, 5 ou 10 mM) + [U-14C] saccharose (0,5 µCi/mL ; 18,43 GBq/mmol) dans du tampon MES (50 mM ; pH 4.5)

Caractérisation de l'effet de sucres compétiteurs ou d'inhibiteurs

Saccharose (5 mM) + [U-14C] saccharose (0,5 µCi/mL ; 18,43 GBq/mmol) dans du tampon MES (50 mM ; pH 4.5) additionné ou non de 50 mM de saccharose, raffinose, glucose, fructose ou maltose (sucres compétiteurs), de CCCP (50 µM) ou de PCMBS (100 µM)

Protocole de dosage des protéines de levures

Effectuer le dosage en triplicata à partir de **300 µL de suspension de levures**

Ajouter **1,7 mL d'eau filtrée**

Ajouter **500 µL de NaOH 15 %** et mélanger à l'aide d'un vortex

Incuber les tubes **5 min dans de l'eau bouillante**, puis laisser refroidir à température ambiante

Ajouter **175 µL de HCl fumant** pour neutraliser la solution et mélanger à l'aide d'un vortex

Réaliser une réaction de **BEARDEN** à partir de **200 µL** de ce mélange :

Ajouter **100 µL de triton 100 X** et mélanger à l'aide d'un vortex et attendre **10 min**

Ajouter **700 µL d'eau filtrée** et **1 mL de réactif de BEARDEN**, puis attendre **10 min**

Lire la **DO 595 nm**

La **quantité de protéine** par point d'absorption est ensuite calculée selon la formule :

$$\text{QP} = \frac{\text{Quantité de protéine dosée} \times \text{Volume final} \times \text{Volume de levure par point}}{\text{Volume levure utilisé pour le dosage} \times \text{Volume réaction de Bearden}}$$

Annexe O

**Noms et numéros d'accèsion des
séquences protéiques de transporteurs
utilisées pour réaliser les arbres
phylogénétiques**

**Noms et numéros d'accèsion des séquences protéiques des transporteurs de
saccharose utilisées pour réaliser l'arbre phylogénétique**

AtSUC1 (*Arabidopsis thaliana*; NP_177333), AtSUC2 (NP_173685), AtSUC3 (NP_178389), AtSUC4 (NP_172467), AtSUC5 (NP_177334), AtSUC6 (NP_199174), AtSUC7 (NP_176830), AtSUC8 (NP_179074), AtSUC9 (NP_196235), DcSUT1 (*Daucus carota*, Y16766), DcSUT2 (Y16768), HbSUT1A (*Hevea brasiliensis*, DQ985466), HbSUT1B (AM492537), HbSUT2A (DQ985467), HbSUT2B (DQ985465), HbSUT2C (AM491808), HbSUT4 (EF067335), HbSUT5 (EF067333), JrSUT1 (*Juglans regia*, AAU11810), LeSUT1 (*Lycopersicon esculentum*, CAA57726), LeSUT2 (AAG12987), LeSUT4 (AAG09270), MdSUT1 (*Malus x domestica*, AAR17700), NtSUT1 (*Nicotiana tabacum*, X82276), NtSUT3 (AAD34610), OsSUT1 (*Oryza sativa*, AAF90181), OsSUT2 (AAN15219), OsSUT3 (BAB68368), OsSUT4 (BAC67164), OsSUT5 (BAC67165), PmSUC1 (*Plantago major*, CAI59556), PmSUC2 (X75764), PmSUC3 (CAD58887), PsSUF1 (*Pisum sativum*, ABB30163), PsSUF4 (ABB30162), PvSUF1 (*Phaseolus vulgaris*, ABB30165), PvSUT1 (ABB30164), RcSCR1 (*Ricinus communis*, CAA83436), RhSUC1 partiel (*Rosa hybrida*, HO762757), RhSUC2 (HQ403679), RhSUC3 partiel (CF349302), RhSUC4 partiel (HO762758), StSUT1 (*Solanum tuberosum*, CAA48915), StSUT2 (AAP43631), StSUT4 (AAG25923), VfSUT1 (*Vicia faba*, CAB07811), VvSUC11 (*Vitis vinifera*, AAF08329), VvSUC12 (AAF08330), VvSUC27 (AAF08331), ZmSUT1 (*Zea mays*, NP_001104840), ZmSUT2 (AAS91375), ZmSUT4 (AAT51689).

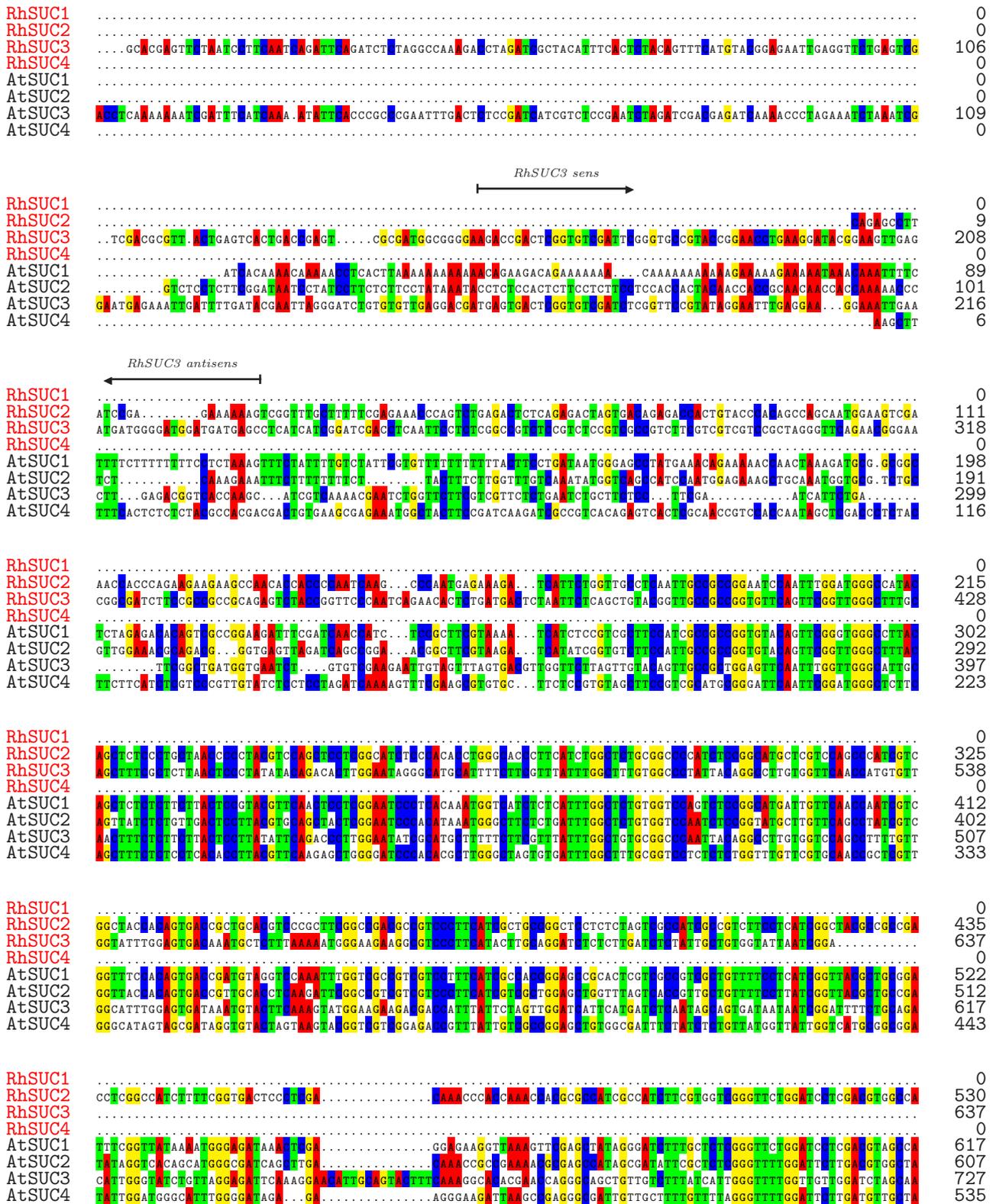
Noms et numéros d'accèsion des séquences protéiques des transporteurs de monosaccharides utilisées pour réaliser l'arbre phylogénétique

AcMST1 (*Ananas comosus*, ABO21768), AtSTP1 (*Arabidopsis thaliana*, AAL24129), AtSTP2 (NP_172214), AtSTP3 (NP_200960), AtSTP4 (NP_001119473), AtSTP5 (NP_174718), AtSTP6 (NP_187247), AtSTP7 (NP_192114), AtSTP8 (NP_197997), AtSTP9 (NP_175449), AtSTP10 (NP_188628), AtSTP11 (NP_197718), AtSTP12 (NP_193879), AtSTP13 (NP_198006), AtSTP14 (NP_177845), AtVGT1 (NP_186959), AtVGT2 (NP_850835), At5g59250 (NP_200733), AtTMT1 (NP_173508), AtTMT2 (NP_849565), AtTMT3 (NP_190717), AtERD6 (NP_001031006), AtSFP1 (NP_568493), AtSFP2 (NP_568494), AtPLT1 (NP_179209), AtPLT2 (NP_179210), AtPLT3 (NP_179438), AtPLT4 (NP_179671), AtPLT5 (NP_188513), AtPLT6 (NP_195385), AtINT1 (NP_850393), AtINT2 (NP_174313), AtINT3 (NP_181117), AtINT4 (NP_193381), AtpGlcT (NP_568328), AtSGB1 (NP_178100), GmMST1 (*Glycine max*, CAD91336) et GmMST2 (CAD91335), HvSTP1 (*Hordeum vulgare*, CAD58958), HvSTP2 (CAD58959), JrHT1 (*Juglans regia*, AAY89231), JrHT2 (AAY89232), LeHT1_partiel (*Lycopersicon esculentum*, CAB52688), LeHT2 (CAB52689), LeHT3_partiel (CAB52690), OsMST1 (*Oryza sativa*, BAB19862), OsMST2 (BAB19863), OsMST3 (BAB19864), OsMST4 (AAQ24871), RcSTA (*Ricinus communis*, AAA79769), RcSTC (AAA79761), RcHEX6 (AAA79857), TaHT1 (*Triticum aestivum*, ACL36477), RhSTP1 partiel (*Rosa hybrida*), RhTP5 partiel, RhSTP7 partiel, RhSTP9 partiel, RhSTP13A1 partiel, RhSTP13A2 partiel, RhSTP13B partiel, RopGlcT partiel (*Rosa* sp., CL_RO_4560.1-19612707), RoSGB1 partiel (CL_RO_2841.1-12076074), RoTMT2 partiel (CL_RO_3853.1-W_W3_B21_01) VfSTP1 (*Vicia faba*, CAB07812), VvHT1 (*Vitis vinifera*, CAA04511), VvHT2 (AAT77693), VvHT3 (AAT09977), VvHT4 (AAT09978), VvHT5 (AAT09979), VvHT6 (AAX47312), VvHT7 (AAX47308) et VvpGIT (AAU07980).

Annexe P

Alignement des séquences nucléiques des transporteurs de rosier à celles de leurs homologues chez l'arabette

Alignement des séquences nucléiques des transporteurs potentiels de saccharose chez le rosier et de leurs homologues chez l'arabette



RhSUC4 sens

RhSUC1
RhSUC2
RhSUC3
RhSUC4
AtSUC1
AtSUC2
AtSUC3
AtSUC4

20
640
637
20
727
717
831
645



RhSUC1
RhSUC2
RhSUC3
RhSUC4
AtSUC1
AtSUC2
AtSUC3
AtSUC4

130
750
637
130
837
827
941
755

RhSUC1
RhSUC2
RhSUC3
RhSUC4
AtSUC1
AtSUC2
AtSUC3
AtSUC4

217
860
637
238
929
910
1047
845

RhSUC1
RhSUC2
RhSUC3
RhSUC4
AtSUC1
AtSUC2
AtSUC3
AtSUC4

318
968
637
348
1037
1018
1157
955

RhSUC1
RhSUC2
RhSUC3
RhSUC4
AtSUC1
AtSUC2
AtSUC3
AtSUC4

367
1060
637
397
1141
1128
1263
1047

RhSUC1
RhSUC2
RhSUC3
RhSUC4
AtSUC1
AtSUC2
AtSUC3
AtSUC4

367
1170
637
397
1251
1238
1373
1154

RhSUC1
RhSUC2
RhSUC3
RhSUC4
AtSUC1
AtSUC2
AtSUC3
AtSUC4

367
1280
637
397
1351
1341
1483
1248

RhSUC1
RhSUC2
RhSUC3
RhSUC4
AtSUC1
AtSUC2
AtSUC3
AtSUC4

367
1390
637
397
1456
1446
1593
1353

RoTMT2	GGTGGC.....GTATTTTTCAGTAGCCTGGGATTGGTGGCGGTGGCGGCTAGCATTGGAAATGGTCTGAGAGATGGCCGGATGGGATAGGAAAGGAGGATTA	385
AtTMT1	TGAGAC.....GACACAGTACCGCTATGCAAGGCCAACGGC...GAAAGTAGCATGGGAATTGGTGGTGGTGGATATGGGATATAGTACGAAAACGATGAATA	1427
AtTMT2	GGAGCTCAAGGGGAAGGACCGGTACTATGGGATTGGAGCTGGAAGGCAGTGGATGGAAATGGACGGAAAGAGATGATCGGGACAGAAAGAGGTGGGTTTA	1500
AtTMT3	ATTGGC.....GTGGAAGTATAAGA..CAAGGT..TGG...GGAGAGGTTAGAGAGTCAATGGCGGTTAAGGATGATATTCGAGGAAACCGCCAA	1310
RoTMT2	AAAGAAATTTATTGTCCEAAGAA	408
AtTMT1	CAAGGGTATATTTAAGAAGATGGAGTGAATCTGGCGTGGGTGATCATCTGTATTC...CGGGAGG.....TCCGGAGGGGGGCAGCTAAAT	1521
AtTMT2	AACCGATATACTTGGATTAAGAAGGTTCACAGGATCTGGACGTGGTCAATTCCTTCATGGCTGGTGGTGAAGGACCGGTGAGGAGCATTTGTACAGCGTCTGCT	1610
AtTMT3	CAACA.....CACAAACAATTCCTTTTTCGGAGGTGGATCACTCTCTCCACACAGAGGGTGA...TGGTATGATCAGGTGAATGGATAGGT	1404
RoTMT2		408
AtTMT1	ACGGTTTTCCTTGAAGAGATCTGTCTGGTCTAAATCAGTCAATGGATCCGTCATGGTCCCGGGAGAAATGTGTCTCTGGACACCTGGTCTGGTCT	1631
AtTMT2	TTGGTTAGCCAAAGAGCTCTTTTCCAAAAGCCTTTTCAAGAACATCAATTGGTCTGTATTTGGTATCATCCATCCGAAAGAAATAMAGGTTAAATGGCATGATGT	1720
AtTMT3	ACGGTCTCTCCACTTCGACCAAGCTTCGATGATGCCAG...AGTTAAAGCCAGACCCGAATGTCTCCAAAGGCGGTTAAG...ATCGTCCAGGCTGGAGGGAGCT	1508
RoTMT2		408
AtTMT1	TTTGAACTTGGTGAAGGTCTCCCTGGTGTGGTGTGGCATTCAAATCTGGAGAGTTTTCAGGTATCAATGGAGTTCTACTACACTCTCTAGATTTCGAAAC	1741
AtTMT2	TCATGATCCCTGGAGTCAAGGGTCCATTAGTCGTAAGGAGTTGGAATTCAAAATACTTCCAGAGTTCCTCAGGCATCAACGGAGTTCTTACTACACCCGAAATCCTTAGG	1830
AtTMT3	GAAAGAGAGAGGGTGAAGAGAGCTTGAAGGTGGAGTGGGTTTGGTATAGTGAAGTTTGGAGGAATAAATGGAGTGAATTTATAGAGCTCAAAATATGGAAAG	1618
RoTMT2		408
AtTMT1	GGGTGGCGTAGATATTCTTCTTTCAGCTCGGCTAAAGTTTCATCTCTGGTATTCCTCAACAGGGTTTAAACAACATTACTCATGTCTCCAGCGATTGTCGTTCTGC	1851
AtTMT2	AGGAGGGTGTCCGGATCTATATGAACAATGGGTTTAGTTTCTCAGGATTCCTACTTATAAGTGAATTTGCAACCTTTGGATGTTAGCTGAATAGCTGTGGA	1940
AtTMT3	AAAGAGTGTGTCAGCTGTTTGAATAAAGCTTGGAAATAGTGAAGAGTCTGATCCGCTCTGTATAAGCGCTTAAACAGACCTCTGATGTTCCCTGATTCTTCTCTGC	1728
RoTMT2		408
AtTMT1	ATCAGATTCATGGATGATCCGGAAGAAGGTCAATCTCTCTGGACATCCCACTTCTCATTTCTCAATTTGCGTCTGTCTCATCCGAGCTCATCCACATCCGAAA	1961
AtTMT2	ATGAGGTTGATGGATCTTTTGGTCCGAAGGACCTTGTCTTGAACAGGATACAAATCTGATAGCATCTTATGGTTHAGTAATTCAAATTTTGTTCADATGAAAG	2050
AtTMT3	ATGAG.....GTTCTGAGGCTTTCGATCTCCCTTCTCAATCTCTGTCGTTGGTAAACAATGGTGT...AGGAGGTTTAGGATCTTGGAG	1813
RoTMT2		408
AtTMT1	AGTGGTGAAGCGACCACTCTCCAGGTTTGGTCTGGTCTTACTTCTGCTTCTTGGATGGGTTAAGGTCCCTTCCAAAACCTCTGTTTGAATCTTCCGAAGA	2070
AtTMT2	CAATTTGCCAGCGGCTTATTAACCGTAAAGCGTTCGTCTTACTTCTGCTTCTTGGTATGGGTTTGGTCTCTCCAAAACCTCTGTTTCCAGATTTTCCAACT	2159
AtTMT3	GTTTAAATAAGCGTTCATATGACAGCAAGCTTACGGTCTCAAAAGGTTTGTGTATGGGTTTGGGGAATTTCCAAAGATCTCTGCTCAGAGAAATCTCGTAGT	1923
RoTMT2		408
AtTMT1	AGAGTCCGGTGGTCTCTGATCGCCATATGCTATGGTCTTTGGATTGGAGACATATATGTCAGGTAATTAATCCCGTTCCTCTCAGCTGATCCGAGTATGTTGGTGT	2180
AtTMT2	CGAGTCCGGGGAATCTGATCGCCATCTCCGCACTCAAGTCTGGATCTGTGACATAATCTCAGTTACACTCTCCCGTGTCTGCTCAAAATCCATTGGATATCGTGGTGT	2269
AtTMT3	TCTGTCTGGGCTCTGTGATCAACATATCTGCTTCAATTTCTGGATCTCTGACATAATCTCAGTTAAGTCTCCAGTCACTGCTCAAAATCCATTGGATCCGAGGAGT	2033
RoTMT2		408
AtTMT1	TTTCAGATTTAGCTTGGCGTTTCCGTATTTGATGGATCTTCGTTTACATGAAAGTCCCGGAGACTAAAAGGATGGCTTGGAAAGTTATCAGAGCTAAATTTGGTTTG	2290
AtTMT2	GTTTGGAAATCTAGCCAAATCGTATCTGCAATTTCAATGGGCTTTTGTGTTCAATAAAGTCCCGGAACCTAAAAGCCATGCCAATTGAAGCTACACAGAGTCTTTTTGTGTG	2379
AtTMT3	CTTTGGATTTATGCAATGCTCTGCTGCTGGGTTTGTGTTACCTCAAGGTACAGAGAAAGGGAAATGCCCTTGAAGTTATCTGTAGTCTTCTCCGACCG	2143
RoTMT2		408
AtTMT1	GGGTCAAGCTTAAAGCTTCTGGTCTTTAAGGAATATACTTGTAACTTCTCTCGTCAATGGCTGTGTACTTAAAGATTCCTCTCATCCCTTTTGTGTTTGT	2400
AtTMT2	GAGGTGAGCAGCTGAAGGTGCAAAAAACGAGGAGAACTGAAGACTCTGTGAGAAAAAGTTGGTGAATATTCATGTGATTTGTTGTCTTTTACTTTTGTG	2489
AtTMT3	GTCAAAAAACAGAAAGCCCTGAGCTTCCTTCTCTCTGTTGGATCA.....	2190
RoTMT2		408
AtTMT1	TTTTCTGATACCTTCAATATGTTTGTCTCTTTTTTTTTTTTTTCTCTTGTTCGTGTCAAAATTAATCTAAATAAGACTCAATTTTCTCTC..	2499
AtTMT2	CAGTAATATCTCTCTCTGTTTCGCTCTTCAAGTGGGAGAAAAAAAGCTTCAAACTTTCAGTTAAGATCTCTTATACCATTTACATATGG	2590
AtTMT3		2190

 A
 T
 C
 G

Les séquences nucléiques de *RoTMT2* (*Rosa sp.*, CL_RO_3853.1-W_W3.B21.01), *AtTMT1* (*Arabidopsis thaliana*, NM_101937), *AtTMT2* (NM_179234) et *AtTMT3* (NM_115008) ont été alignées à l'aide des logiciels clustalW et Latex. Les amorces utilisées pour la RT-PCR quantitative sont indiquées par des flèches.

Alignement des séquences nucléiques des pGlcT/SGB1 (Plastidic Glucose Transporter/Suppressor of G Protein Beta1) potentiels chez le rosier et de leurs homologues chez l'arabette

RopGlcT	0
RoSGB1	0
AtpGlcTAGCTCCAAGGAGTTCCTCTCAGCAATCACAATCTATGTGGTTTAAGCCCT	53
AtSGB1	ATCATGCTTGTGTTGTTTGTTCATCCCTGCTTCCTTGGTTTCCTTGTAGATCTGCCATTGGCTTTTAAATCCAATCTTAATTTCTGATTTACATTGC	105
RopGlcT	0
RoSGB1	0
AtpGlcT	CATATGCTCTCTCTCAATCGGGAGTCTCGAAGTTCCTCGACAAAAGCAGTCGCAACGTATGCGGTAAAGGAAACGCTCGGTTCGGTTTCAGAGACG	158
AtSGB1	TTCCGTTAGATTCGAAGAAGTACTTTCTGATCTCGTGCACGCTTTTGTTCCTTTTCTCTCTTTTATTTTAAAAATAAAATATATGTTGATTCTG	209
RopGlcT	0
RoSGB1	0
AtpGlcT	GACCTTCTGCTCGACAGTCGACGACTTTATCGGAATTGGTTTCGCTGGTTATAGAGCTTAGCCACACCGGGCCCTCTACTGTTCTGGTTGTGAAGCCAT	263
AtSGB1	GAATTTCCCTAGTAGCTCAAGTCAAGTATGTCGTGTCGTTTGAATTTTAAATTGACTCGCAAGGTGGTTTTGATTAATGTGAGCCCTGTTTCAGAGGGGA	314
RopGlcT	0
RoSGB1	0
AtpGlcT	GGGA.....GGAGCCTTGTCTGTGCTGATAACGGGATCCAGAGCCTTTCAGTTCTCTTGTCAAGCTCGATGGTCAGAGCTCAAGCCTCTTGTATG	361
AtSGB1	TGGATTCTGTTGAGGACTTAACCAATAGCGAGGCTGTCCTAGACAGCGTTCCTTAAAGGTTTCTCTGCTTTGGATAAAGCTGAATGTCAG	419
RopGlcT	0
RoSGB1	0
AtpGlcT	GGATGAAGAAGAACTATACCTCTGAGATCTGAAGGGAAAAGCTCGGAACAGTTCGCTTTGTTGGTGTGGCTGCTGGCTTAACTCTTGGTTATG	466
AtSGB1	TCCCTTCTCTACTGGGCGGAAAAGACTCGGGAATCCTCTCGGAAGCGTCTCTGCTCAGCTGCTCGTTGCTTCTGACTTGGCTTTTATCGCTATC	524
RopGlcT	0
RoSGB1	0
AtpGlcT	ATCTGGGGTGGTAAATGGTCTCTGAATATCTTGGTAAGGATCTTGGGATCGCCGAAAATATGCTTTTGCAAGGATGGAATGTTAGTCTCTGCTTGCTGGTG	571
AtSGB1	ATCTGGGGTGGTAAATGAAACTCCAAAGCATATCAATTGACCTGGCTTAGTGGCAACACAAAGCTCAAGGCTTGGTATGCACTGCTTAGCGCGCC	629
RopGlcT	0
RoSGB1	0
AtpGlcT	TACGGTAGGTTAATCACTGGAGGTGCATTAGGTGCAAAATTTGGAAGAACAAGAAATTTTAAATTGGATGATCCCGCTTGCCATTTGGAGCTTCTTATGTC	676
AtSGB1	CTTTATGGGTCTCTGTTCACTGGGTGGTAGTCAATGGTGTGGGCGCGTAGGTTTCCAGTTGAGCCCTTAAACAAGATTGTTGGAGCTTCTGAGATG	734
RopGlcT	0
RoSGB1	0
AtpGlcT	CAACAGTCTGAGGTCGACAGACTATGATGTTGGGCGCTCGCTCGTGGAAATGGAAATGGAAATCTCATAGCGATTGTGCACTTACATATCTGAGAAATCAC	781
AtSGB1	ATCAAGTGAAGTCTTATGGCAAGCTCCGGGAGGTTTTGGTGGAAATGGGATGGCAAGGTCCTTGTGTACAGTCTCTATGCAAGAGGAGTCAAC	839
RopGlcT	0
RoSGB1	0
AtpGlcT	AACTGAAATCCGTGGAGCACTCGGATCTGTGACGAGTTGTCTCTGTATAGGAATACATGTCAGCTTGATAGTGGATTAAGCCCTTGCAGCAAACTCTAT	886
AtSGB1	CTGCTTTGTTGAGAGGTAATATGGAGTTCTCCGAAATCGCAACATGTTTGGCTCTAGGTTGCTGTTTGTGGAAACCGGGCAAAAGTAACTTTGGCT	944
RopGlcT	0
RoSGB1	0
AtpGlcT	GGTGGAGGCGATGTTGGTGTGAGTTATCCCTTCGTTCTATGGCAATAGGAATGGCTTTCTCCAGAAAGCCAAAGGTGGTTCGTTTCAGCAAGGAAAAAG	991
AtSGB1	GGTGGGCAATATGTTTGGATATCACAGTCCAGCTGCAAGCTGTGCTTCTTCAAGAACCTCGGTGAAAGTCTCAGTGGTTTTTAAAGAGGGGAAGGG	1049
RopGlcT	0
RoSGB1	0
AtpGlcT	TCTGTGAAGTCAAAAGCCGATCAAACTTGTATGGTAAAGAAAGATGGTTGAACATAGTCGCGACTTTCAGCCTTGGCCAAAGTTCCTGAGCCGGAGG	1096
AtSGB1	CAGCTGAAGTGAAGCTGTGTTTGAAGCTAATGGGAGGTCGTACGCAAAAGCTGCTAAGGCAGGTTTGTGAAGTGGATAGGGGAGATGACCCGATTACG	1154
RopGlcTGCAAGAGGTCAAATTTTGGTTGATC	26
RoSGB1	0
AtpGlcT	AGGATGGTTTGAATATCAGCAGCCGTACTGGAAAGTTGAAGCGTAGGTGGGTCTCTCTGTTTAAAGGTAGCCGGGATAAAAGCAATGTCATTT	1201
AtSGB1	CAAAATTTGCGGATTTGCTTTTGGAGGAGTTTACAGTGGTTTTAATGGATTAAGCTTTTGTCTTAAAGAGTTGTGGGATAAATGCTGTTGTTGATT	1259

RopGlcT	AGAGGAGAGTGGTGTGGGGTCAAGTCAAAAGCAAGGAAAGGTCTGGGGTAAAGTACAGGGTTAAAGAAATGTGATGACAGAAAGGCAGTGGGTTT	131
RoSGB1GCACGGAG...GAAATTC...GGATGTGTTCGAA...TGGGTTT	39
AtpGlcT	ACTTCACATGGTATTCGGTAGTGGGAATCAATCAGATGTTGGAGCCAGTG.TCTCGTTGGAGCATCAAAATGCTTTGGCACTGCTTGTGTT.CATGTT	1304
AtSGB1	TCTCATAAATGCTCTTAAAGAAAGTGGTGTACCTTCAGCCTCTGAAAASA...TATGTGTAGGACTTGGCAACCTGTTAGGATCAAAATGCTGTG.TGGTTTT	1359
RopGlcT	GGTGGATT.....GAAGCTCCTTGTGGCCTATGGGGCCAA...GTGGACGTCGTGATGG...GATTCGATGACTTC..TTGAAACCAGATGAGTC	221
RoSGB1	GATGGATAAAGAGGAAGGAGGTGTAATGTTATGGAGTTCTTGGATGGGATGGAAATG...GGTGTCAAGTAGTT.GGAGCAAGTTCATATCTTC	138
AtpGlcT	GATGGATAAAGAGGAAGGAAAAGTCTTTAATGACAAAGTCTTGGGGAATGGTTTGTGAATGCTGTTAATGCTGTTCCCTTACATGGAAGGTTTGGTGGC	1409
AtSGB1	GATGGATAAGCTGGGGAGAAAAGTGTGCTTATGGAGTCTTGGGGATGGAGTATCGCTC...GGTCTCCAGCAATA.GGATATCTTCGGTTCCCTTC	1458
RopGlcT	MAAGCTCACGCTGT...TTTGAAGCAGATGGAGCGTTGAGAACTGTCTCCTCCAAGCTCAGGTAAAAT...TTTGGAAAGGTGGGCAATTTGTGG	319
RoSGB1	AGGCTCTGGGTAAATGACATATGTTGGTGGAAATGGATGATGTTGCTTAAATTTTGGCCATAGGAGGGGACAGTTCAGGTCCTTTTACCAAGAAATATT	243
AtpGlcT	CTATCTGGAA...CCTTGGCGTGTGGAACTGTCTATATGCTCCGTGATTTCTCAATTTGGTGTGGCCGGTAGGGCTCTTCTCTCCAGAGATATT	1508
AtSGB1	GCCCTTGGAACTGTCTTCTCGGTGGAGGAATGGTGTCTGTTGTTGTTGAAACGGAGGGGTCTCTTCCAGTCTTCCCTGTGTGAGATATG	1563
RopGlcT	TGTTGCCTGCTTGGAGCCTTTTATTG..GTTATCATCTGGGGTGGTAAATGGTGTCTTGGATACCTGTGGAAGATCTTGGTATTACTGAAAACGTTGCA	422
RoSGB1	TCAGGTGGCAACAGGGGAAAAGCAAGGTTGCTGATGTCAGTGGTTGGGGGATAAAATTTTCCTGGGGTTGGTTCCTGCAACTACAGAAAATCTTGG	348
AtpGlcT	TGCATCCGAAATCAGAGGAAAAGCCGCTCTCTTCTCTGGATGCACTGGAAATCAAACTTTGTGATCGGACTATACTTCTTAAACGTTGACTAAATTCGG	1613
AtSGB1	CCCTGGTGCCTCGAGCAACTGGTGGTGTGCTCTGGTGGTCTGCTGGTGTGTTGAACTTTTGTGGGGTGGTGTCTTCGAGAAAGTGGAGCACTAGG	1668
RopGlcT	TTAAAAGGGTGGTGGTGCACAC.TTCTAGCTGGTCCACAGTGG.GATGTTTCACTGGTGGAAATGGCTGACCAAGTTGGGAGAACTAGACTTTTCAC	525
RoSGB1	CCACAGTTCCTGATTTCTAATGTTGGTACTGTTGCAATGATAGCTGGTGGTTTGTGAAACGGAAATGTTGGTGGAA...GTAAAGGAAAATCCGCTCAAGAGA	449
AtpGlcT	AATCCAGCAGGCTACTTGGGTTTGGCGGCTCGCTGGTATGCACTGGAAATCAAACTTTGTGATCGGACTATACTTCTTAAACGTTGACTAAATTCGG	1714
AtSGB1	TTGGTGTCTCAAAATGCAATATTGGTCTCTCTGTGTGGTGGAGTCTGTTTGTGCAAGAAAGCT.GGTGAGA...GTAAAGGAAAAGGCTACAGAGA	1769
RopGlcT	TTGTGCAATTCATTAAGATGGAGCAATTTTATGTGCACAGCACAGAGTGGAGCANATGATAGTGGCCGCTTCTTGTGGCTTTGGAAATCGGCATCT	630
RoSGB1	TTGAGATAG...CGTCCCTCCACAGAAATGAGGTTGCTTTAATAATGGA.....	498
AtpGlcT	TAGAGCTTGCCTTACATCTGGAGTTGAAATTAACAAAAGAAATCAGCAGACAAAACCCAGTTTGTTTATTAATTTAGTTTCTGAGTCTTTTCTTAATCTCC	1819
AtSGB1	TAGAAATCAGTGTGCTCTTCAACCGAGATGATTTCTTATTCAGAGAAATCGTATTATCTTCGGTTCTTTTTCCTTTGGAGAGAAAGTAAAG	1874
RopGlcT	CTTCGGCT.....	639
RoSGB1	498
AtpGlcT	TCTTTAATGTCAATGGCGAGCTTATCATACAGGAAATTTTTCATGACCACT.....	1880
AtSGB1	TGTACTAATATGGAGTAGGAGTGCAGTACTAAGTAAAGCAAAATGTAAGGAAATGGATATTATTATTTCAGATATAGCCAAAGTTTCAACTGATTTTGTAA	1979
RopGlcT	639
RoSGB1	498
AtpGlcT	1880
AtSGB1	TAAACATAAGACGAAAGTTTATTCAACAATGGTAGGTTGTCAAGTCAATGTAAG	2031

 A
 T
 C
 G

Les séquences nucléiques de *RopGlcT* (*Rosa sp.*, CL_RO_4560.1-19612707), *RoSGB1* (CL_RO_2841.1-12076074), *AtpGlcT* (*Arabidopsis thaliana*, NM_121620) et *AtSGB1* (NM_106631) ont été alignées à l'aide des logiciels clustalW et Latex. Les amorces utilisées pour la RT-PCR quantitative sont indiquées par des flèches.

RhSTP1
RhSTP5
RhSTP7
RhSTP9
RhSTP13A1
RhSTP13A2
RhSTP13B
AtSTP1
AtSTP5
AtSTP7
AtSTP9
AtSTP13

AGATTTCAGGCCGGGAGAAATCATGCTTCTGGGTGGTTCACCTTTCCTGTTGGGGCTGCCTTAAACGGTGGAGCTTAAATATGGCATGTCATGTTGGTTC
GAAATATAGGCCCGCCCAATGATAAATGCTGGTGGAAACAGTTTCCTATTGGGCAACCTGAAATGCTGAGGCTTAAATGCATCATGTCATGTTGGTTC
GAAACTTGGGAGGAGACCTTCATGCTTATTGCGGGGTGTTCTTCATAGTTGGAAAAATTCCTAAACGGTGGAGCTCAAGATCTTGGCATGTCATGATTGGGA
GAAACTTGGGAGGAGACCTTCATGCTTATTGCGGGGTGTTCTTCATAGTTGGAAAAATTCCTAAACGGTGGAGCTCAAGATCTTGGCATGTCATGATTGGGA
AAAAGCTAGGCAGAAAGCTTCATGCTTATTGCTGGGATTTCTTCATAGTTGGCAAGTTCTTAACTTCGATTCACAAAATCTTGGTTCGGTCAATGTTGGGA
GAAAATTCGGACCGCGGCTTCGATGCTTCTTCGGAATTCCTTCGACCTCAATGTTTCGCGCAAAACATGTTGGATGTCATGTCATGTCGGTTC
CGGCTTATGGTCCCGAATCAACATGATCTGGGGTTCACITTCCTTTTGGTGTCTGATCAATGCTTGGTGTCAACATCGGATGTCATGTCGGTTC
GGACTACGGTAGCCGTGGCAGTATTGTTGGTGGAAACAGCTTTTCTTATTGGTCTGGTTGAAATGTTGGAGCTGTGAACCTAGTATTGTTCTTGGCCGAC
GGAAATACGGACCGCAAAATTCATGTTTGGAGGGGTTGCTTTCCTAATAGGTTCTCAATTCACCAATTTGCTACCAATGTCGGAATGTCATGTTGGTA
GAAACGTCGGAAGGAGGCAAAATGATGCTAAGCAGGCGTTTCTTCATTAAGGTTGGCTGCAACCGGGGGTCAAGCCAGGATGTTTTCGAGGCA

0
313
284
0
328
328
331
548
498
624
424
493

RhSTP1
RhSTP5
RhSTP7
RhSTP9
RhSTP13A1
RhSTP13A2
RhSTP13B
AtSTP1
AtSTP5
AtSTP7
AtSTP9
AtSTP13

.....CCGTACAGTAAGAGGAGCTCTCAACATTTGGTTTC
GTATGTTGGTCGGAATTTGGTTCGGCTTTCAGCAACCA
GGATCAATGCTGGCTTCGGAATCGGCTTTCGAAATCGGCTAATTCGATTTATCTAATGGGCAATCGACCAATCATCTCCGAGGAGGAGTCAACATGATGTTTC
GGATGTTAATGTTGGTTCGGAGTTGGTTTTGCAATCGGGTGAACCTGCTTCCTTTGGAGATTGACCTACTAGGAT
CGATCTTACTGGTTCGGAGTTGGTTTTGCAATCGGCTGAACCTGCTTCCTTTGGAGATTGACCTACTAGGAT
GGGTTTTCGGTTCGGAGTTGGTTTTGTAATGAGGTTTTCGCAATTTTCGCTTTCGGAGATTGACCTACTAGGAT
GTATGTTGTTGGTTCGGTTCGGTTTTGCAATCGGGTGAACCTGCTTCCTTTGGAGATTGACCTACTAGGAT
CGATTTTCCTAGGATTTGGTTCGGTTTTGCAATCGGCTGAACCTGCTTCCTTTGGAGATTGACCTACTAGGAT
GGATGATGCTGGTTCGGTTCGGTTTTGCAATCGGCTGAACCTGCTTCCTTTGGAGATTGACCTACTAGGAT
GATGTTGCTGGAGTCGGTTCGGTTTTGCAATCGGCTGAACCTGCTTCCTTTGGAGATTGACCTACTAGGAT
GGATATTGCTGGTTCGGAGTTGGTTTTGCAATCGGCTGAACCTGCTTCCTTTGGAGATTGACCTACTAGGAT

37
350
389
0
407
407
410
653
603
729
529
598

RhSTP1
RhSTP5
RhSTP7
RhSTP9
RhSTP13A1
RhSTP13A2
RhSTP13B
AtSTP1
AtSTP5
AtSTP7
AtSTP9
AtSTP13

RhSTP1 sens
AGCTTTTATCACAATTTGGTATGCTTCGCGCAAAATTTGTAATTTACTTCTTGGCAAGATAAAGGGGGTGGGGATGGCGTTTGGATTTGGGTTGGTGAATGG
AGTTAGAACAA
AGTCTAAATTAANTGGATTCGCTTGGGAGTGCATAAATTAAGTACTTCTTGGCAAGATAAAGGGGGTGGGGATGGCGTTTGGATTTGGGTTGGTGAATGG
CATGCTTCATGCTATGGGAGTAGTAGCAGCCAACTAAATAATTAAGTACTTCTTGGCAAGATAAAGGGGGTGGGGATGGCGTTTGGATTTGGGTTGGTGAATGG
AGTAGTTACAGTATGGGATTTTACAGCAACATGTTAATTAAGTACTTCTTGGCAAGATAAAGGGGGTGGGGATGGCGTTTGGATTTGGGTTGGTGAATGG
AAAGGTTAATACCTTGGGATTTGATTGAACCTAACTCAACTAGGAGATTCCTAATTTGGCTAAGAACGGTGGGGATGGAGGTTATCGTTAGGTTTGGCGGAA
AGCTAACCTCACTATTGGTATGCTTTCGCAACTTGGGACGGCAAGATAAAGGGGGTGGGGATGGAGGTTATCGTTAGGTTTGGCGGAA

142
350
401
0
407
407
410
758
702
831
631
703

RhSTP1
RhSTP5
RhSTP7
RhSTP9
RhSTP13A1
RhSTP13A2
RhSTP13B
AtSTP1
AtSTP5
AtSTP7
AtSTP9
AtSTP13

RhSTP1 antisens
TCCTGCGCTTATCTACCGTTCGGTCCCTAATAATAGAGACACCAAAATCTAATGGTGGAGCCGGCCGCAAGAGAAAGCCAGACCCATTCGGGGA
TCCTGCGCTTATCTACCGTTCGGTCCCTAATAATAGAGACACCAAAATCTAATGGTGGAGCCGGCCGCAAGAGAAAGCCAGACCCATTCGGGGA
TCCTGCGCTTATCTACCGTTCGGTCCCTAATAATAGAGACACCAAAATCTAATGGTGGAGCCGGCCGCAAGAGAAAGCCAGACCCATTCGGGGA
TCCTGCGCTTATCTACCGTTCGGTCCCTAATAATAGAGACACCAAAATCTAATGGTGGAGCCGGCCGCAAGAGAAAGCCAGACCCATTCGGGGA
TCCTGCGCTTATCTACCGTTCGGTCCCTAATAATAGAGACACCAAAATCTAATGGTGGAGCCGGCCGCAAGAGAAAGCCAGACCCATTCGGGGA
TCCTGCGCTTATCTACCGTTCGGTCCCTAATAATAGAGACACCAAAATCTAATGGTGGAGCCGGCCGCAAGAGAAAGCCAGACCCATTCGGGGA
TCCTGCGCTTATCTACCGTTCGGTCCCTAATAATAGAGACACCAAAATCTAATGGTGGAGCCGGCCGCAAGAGAAAGCCAGACCCATTCGGGGA
TCCTGCGCTTATCTACCGTTCGGTCCCTAATAATAGAGACACCAAAATCTAATGGTGGAGCCGGCCGCAAGAGAAAGCCAGACCCATTCGGGGA
TCCTGCGCTTATCTACCGTTCGGTCCCTAATAATAGAGACACCAAAATCTAATGGTGGAGCCGGCCGCAAGAGAAAGCCAGACCCATTCGGGGA
TCCTGCGCTTATCTACCGTTCGGTCCCTAATAATAGAGACACCAAAATCTAATGGTGGAGCCGGCCGCAAGAGAAAGCCAGACCCATTCGGGGA

247
350
401
0
407
407
410
863
807
936
736
808

RhSTP1
RhSTP5
RhSTP7
RhSTP9
RhSTP13A1
RhSTP13A2
RhSTP13B
AtSTP1
AtSTP5
AtSTP7
AtSTP9
AtSTP13

RhSTP1 antisens
TTGCGGCCCTTATGATGTAAGAGGGAGTTCAATGACCTTATTGTTAGCTAGCTTGAAT.....GAAAGAGATAGAGGATGATGGGGAATCTAAT
TTGCGGCCCTTATGATGTAAGAGGGAGTTCAATGACCTTATTGTTAGCTAGCTTGAAT.....GAAAGAGATAGAGGATGATGGGGAATCTAAT
TTGCGGCCCTTATGATGTAAGAGGGAGTTCAATGACCTTATTGTTAGCTAGCTTGAAT.....GAAAGAGATAGAGGATGATGGGGAATCTAAT
TTGCGGCCCTTATGATGTAAGAGGGAGTTCAATGACCTTATTGTTAGCTAGCTTGAAT.....GAAAGAGATAGAGGATGATGGGGAATCTAAT
TTGCGGCCCTTATGATGTAAGAGGGAGTTCAATGACCTTATTGTTAGCTAGCTTGAAT.....GAAAGAGATAGAGGATGATGGGGAATCTAAT
TTGCGGCCCTTATGATGTAAGAGGGAGTTCAATGACCTTATTGTTAGCTAGCTTGAAT.....GAAAGAGATAGAGGATGATGGGGAATCTAAT
TTGCGGCCCTTATGATGTAAGAGGGAGTTCAATGACCTTATTGTTAGCTAGCTTGAAT.....GAAAGAGATAGAGGATGATGGGGAATCTAAT
TTGCGGCCCTTATGATGTAAGAGGGAGTTCAATGACCTTATTGTTAGCTAGCTTGAAT.....GAAAGAGATAGAGGATGATGGGGAATCTAAT
TTGCGGCCCTTATGATGTAAGAGGGAGTTCAATGACCTTATTGTTAGCTAGCTTGAAT.....GAAAGAGATAGAGGATGATGGGGAATCTAAT
TTGCGGCCCTTATGATGTAAGAGGGAGTTCAATGACCTTATTGTTAGCTAGCTTGAAT.....GAAAGAGATAGAGGATGATGGGGAATCTAAT

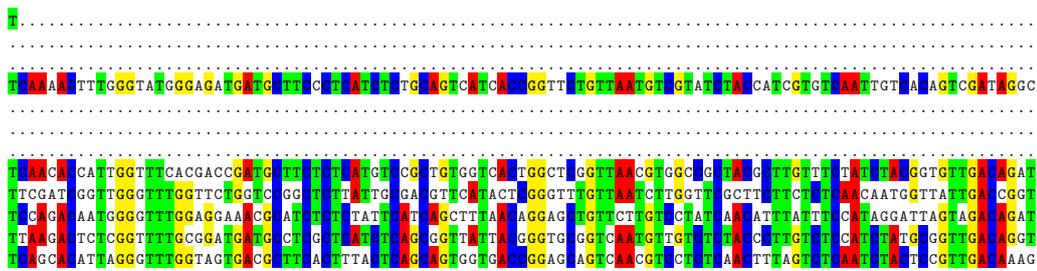
340
350
401
0
407
407
410
956
912
1026
829
898

RhSTP1
RhSTP5
RhSTP7
RhSTP9
RhSTP13A1
RhSTP13A2
RhSTP13B
AtSTP1
AtSTP5
AtSTP7
AtSTP9
AtSTP13

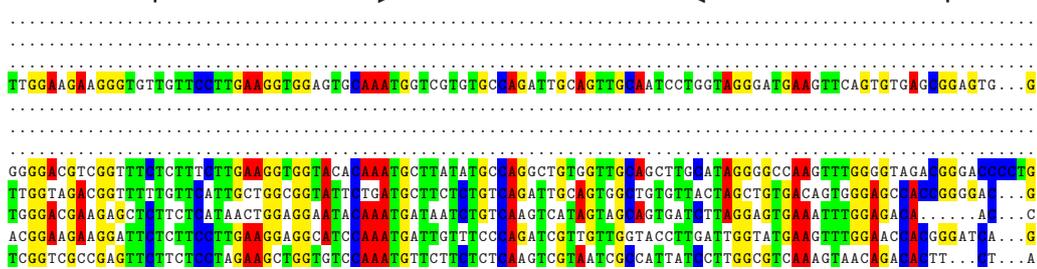
TTAAGAGG.....AGTAGAGGCGCAAACTGCGTGGGAAATTCGATTCGATCTTTTAGGAGCTTACGGTTCATTAATGCGATGATGTTCTATGTTTCGGTTCTG
TTAAGAGG.....AGTAGAGGCGCAAACTGCGTGGGAAATTCGATTCGATCTTTTAGGAGCTTACGGTTCATTAATGCGATGATGTTCTATGTTTCGGTTCTG
TTAAGAGG.....AGTAGAGGCGCAAACTGCGTGGGAAATTCGATTCGATCTTTTAGGAGCTTACGGTTCATTAATGCGATGATGTTCTATGTTTCGGTTCTG
TTAAGAGG.....AGTAGAGGCGCAAACTGCGTGGGAAATTCGATTCGATCTTTTAGGAGCTTACGGTTCATTAATGCGATGATGTTCTATGTTTCGGTTCTG
TTAAGAGG.....AGTAGAGGCGCAAACTGCGTGGGAAATTCGATTCGATCTTTTAGGAGCTTACGGTTCATTAATGCGATGATGTTCTATGTTTCGGTTCTG
TTAAGAGG.....AGTAGAGGCGCAAACTGCGTGGGAAATTCGATTCGATCTTTTAGGAGCTTACGGTTCATTAATGCGATGATGTTCTATGTTTCGGTTCTG
TTAAGAGG.....AGTAGAGGCGCAAACTGCGTGGGAAATTCGATTCGATCTTTTAGGAGCTTACGGTTCATTAATGCGATGATGTTCTATGTTTCGGTTCTG
TTAAGAGG.....AGTAGAGGCGCAAACTGCGTGGGAAATTCGATTCGATCTTTTAGGAGCTTACGGTTCATTAATGCGATGATGTTCTATGTTTCGGTTCTG
TTAAGAGG.....AGTAGAGGCGCAAACTGCGTGGGAAATTCGATTCGATCTTTTAGGAGCTTACGGTTCATTAATGCGATGATGTTCTATGTTTCGGTTCTG
TTAAGAGG.....AGTAGAGGCGCAAACTGCGTGGGAAATTCGATTCGATCTTTTAGGAGCTTACGGTTCATTAATGCGATGATGTTCTATGTTTCGGTTCTG

442
350
401
56
407
407
410
1058
1017
1131
934
1003

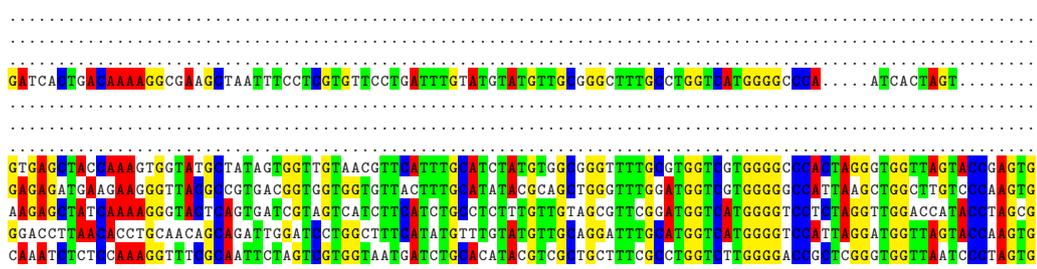
RhSTP1 443
 RhSTP5 350
 RhSTP7 401
 RhSTP9
 RhSTP13A1
 RhSTP13A2 161
 RhSTP13B 407
 407
 410
 AtSTP1
 AtSTP5
 AtSTP7
 AtSTP9
 AtSTP13 1163
 1122
 1236
 1039
 1108



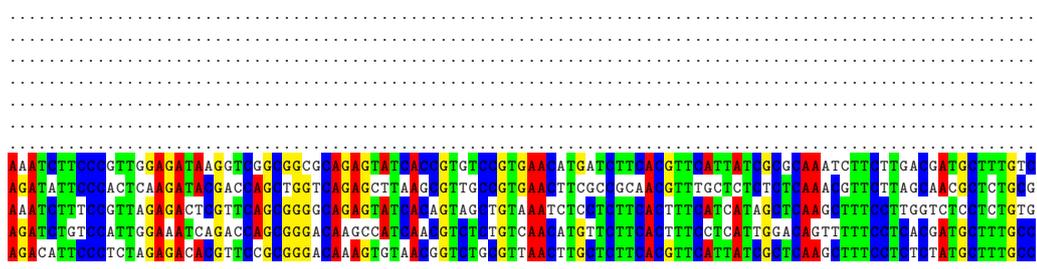
RhSTP1 443
 RhSTP5 350
 RhSTP7 401
 RhSTP9
 RhSTP13A1
 RhSTP13A2 263
 RhSTP13B 407
 407
 410
 AtSTP1
 AtSTP5
 AtSTP7
 AtSTP9
 AtSTP13 1268
 1224
 1332
 1141
 1207



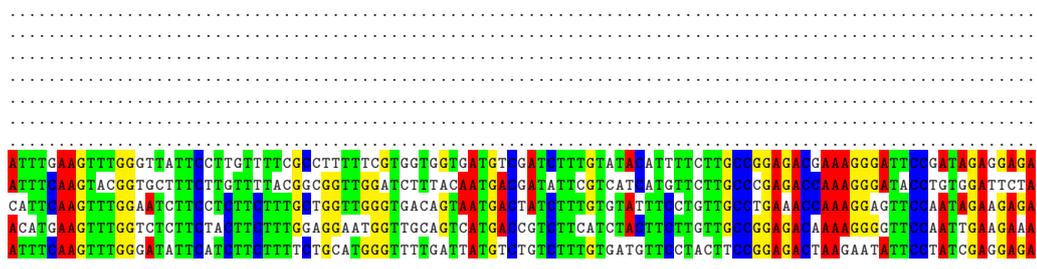
RhSTP1 443
 RhSTP5 350
 RhSTP7 401
 RhSTP9
 RhSTP13A1
 RhSTP13A2 355
 RhSTP13B 407
 407
 410
 AtSTP1
 AtSTP5
 AtSTP7
 AtSTP9
 AtSTP13 1373
 1329
 1437
 1246
 1312



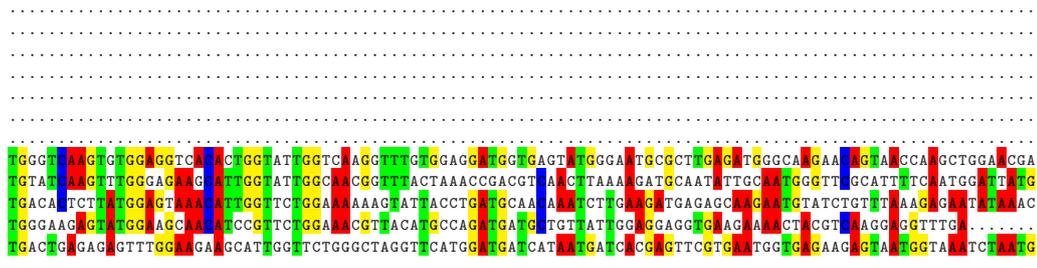
RhSTP1 443
 RhSTP5 350
 RhSTP7 401
 RhSTP9
 RhSTP13A1
 RhSTP13A2 355
 RhSTP13B 407
 407
 410
 AtSTP1
 AtSTP5
 AtSTP7
 AtSTP9
 AtSTP13 1478
 1434
 1542
 1351
 1417



RhSTP1 443
 RhSTP5 350
 RhSTP7 401
 RhSTP9
 RhSTP13A1
 RhSTP13A2 355
 RhSTP13B 407
 407
 410
 AtSTP1
 AtSTP5
 AtSTP7
 AtSTP9
 AtSTP13 1583
 1539
 1647
 1456
 1522



RhSTP1 443
 RhSTP5 350
 RhSTP7 401
 RhSTP9
 RhSTP13A1
 RhSTP13A2 355
 RhSTP13B 407
 407
 410
 AtSTP1
 AtSTP5
 AtSTP7
 AtSTP9
 AtSTP13 1688
 1644
 1752
 1554
 1627



RhSTP1	443
RhSTP5	350
RhSTP7	401
RhSTP9	355
RhSTP13A1	407
RhSTP13A2	407
RhSTP13B	410
AtSTP1	AGCATGTTGGATTTCATTGTTTAAAGAGGTTTAAAGAAAAGAAAGAAAAGATTGTAAATTTCAATGTCCGTAAAGGAAAAGTGTATTGGCTAGATAT	1793
AtSTP5	TTAATTAAATGTTAGGATTAAGGATATAAGAGTCATGACAAATCGTATCCAAATTGGTTTAAATATCGAAGTTGCATGGTACCTGGAAAGATATC	1749
AtSTP7	TGATTCAGAAACTTATGTTTGTATTACTATAAGGTTTTTATTGCATAGGAGAGATTGAATCCC.....	1819
AtSTP9	1554
AtSTP13	GCCTTGGTCCTCACCACGGCTTAAAGTGGTTAAAGAGCCCTAACCAAGTGAAGCAGAGAGAGGAAAGAGGTGGTAAACACACCAAAGTGGAGAGG	1732

RhSTP1	443
RhSTP5	350
RhSTP7	401
RhSTP9	355
RhSTP13A1	407
RhSTP13A2	407
RhSTP13B	410
AtSTP1	TTATTGGTGTATTAATAATCAATCCACATGAGAAATTAAGAAATGATGATCTTCCGCAAAAAAATAAATAA.....	1867
AtSTP5	GTTCCGACACATATGTTTTAACACGTAGCTACCTGGTAAGGTGGGAGGCAACTGACCCAAACAGATTTTGAATAAATAATTATTTGTAATTAAATTC	1854
AtSTP7	1819
AtSTP9	1554
AtSTP13	GAAATGCAAGTTTCATTCTATCCAGTGTACTAAATTCCTTACTTTAGTTGAAGTGGTTTGTGAATAAGGAAAGCTTTTCTTTGCTTGTGGTTC	1837

RhSTP1	443
RhSTP5	350
RhSTP7	401
RhSTP9	355
RhSTP13A1	407
RhSTP13A2	407
RhSTP13B	410
AtSTP1	1867
AtSTP5	TTAGGTAAACTTAAGTCAACGGTAAATAAGCTTTATGAATGATCCCTTCTCTTTGCTCT.....	1918
AtSTP7	1819
AtSTP9	1554
AtSTP13	AAATGTCATCCCTGAGTCCAAATTTCTCAAGTGGTACATGATATGTCAACTCAAAAATTGCAATGCGATTTTCTTAAAAATGTTGGTAGGTAATGTTT	1942

RhSTP1	443
RhSTP5	350
RhSTP7	401
RhSTP9	355
RhSTP13A1	407
RhSTP13A2	407
RhSTP13B	410
AtSTP1	1867
AtSTP5	1918
AtSTP7	1819
AtSTP9	1554
AtSTP13	ATGGGCGAATAATAGGTTTCTTATGGGCTATAAAGGACTGTATAAATTATT	1993

X A
X T
X C
X G

Les séquences nucléiques de *RhSTP1* (*Rosa hybrida*), *RhSTP5*, *RhSTP7*, *RhSTP9*, *RhSTP13A1*, *RhSTP13A2*, *RhSTP13B*, *AtSTP1* (*Arabidopsis thaliana*, AY059781), *AtSTP5* (NM_103182), *AtSTP7* (NM_116436), *AtSTP9* (NM_103915) et *AtSTP13* (NM_122535) ont été alignées à l'aide des logiciels clustalW et Latex. Les amorces utilisées pour la RT-PCR quantitative sont indiquées par des flèches.

RESUMÉ

Le débourrement des bourgeons végétatifs, étape clé de la mise en place de l'architecture d'une plante, est sous le contrôle de facteurs endogènes et des facteurs de l'environnement. Les bourgeons sont des organes puits qui nécessitent d'importer des sucres pour débourrer. Peu de données sont cependant disponibles sur cette importation et sur le rôle des transporteurs de sucres dans ce processus. Chez le rosier buisson (*Rosa hybrida*), des résultats précédents à cette étude ont montré que les bourgeons ont un besoin absolu de lumière pour débourrer, même en l'absence d'inhibitions corrélatives telles que la dominance apicale. Le photocontrôle du débourrement implique une stimulation du métabolisme carboné à la lumière, indiquant une mobilisation du saccharose en provenance de la tige. Le principal objectif de cette thèse a été de déterminer le rôle des transporteurs de sucres dans le photocontrôle du débourrement des bourgeons de rosier. Des expériences de culture *in vitro* ont montré que les bourgeons de rosiers ont besoin d'importer des sucres métabolisables (saccharose, glucose ou fructose) pour débourrer à la lumière. Un apport exogène de ces différents sucres stimule également leur débourrement à l'obscurité (condition inhibitrice). Après décapitation (levée de dominance apicale), l'utilisation de sucres radiomarqués a permis de montrer que le photocontrôle du débourrement est concomitant à une accumulation d'hexoses puis de saccharose, faisant intervenir à la fois un transport passif et actif des sucres. Cette accumulation pourrait donc impliquer des connexions symplasmiques ainsi que l'activité de transporteurs de sucres. Des marquages de la sève phloémienne à l'aide d'un traceur fluorescent ont montré que les bourgeons dormants sont isolés de la portion de tige adjacente et que des connexions s'établissent lors des stades tardifs du débourrement. Afin d'étudier le rôle des transporteurs de sucres dans le photocontrôle du débourrement, nous avons isolé 10 transporteurs potentiels de glucides (3 de saccharose et 7 d'hexoses). Les analyses d'expression des différents gènes codant ces transporteurs par RT-QPCR suggèrent que le co-transporteur de saccharose/H⁺ *RhSUC2*, ainsi que les transporteurs d'hexoses potentiels *RhSTP1* et *RhTMT2* sont impliqués dans le photocontrôle du débourrement. La validation fonctionnelle de *RhSUC2* a été effectuée chez la levure et confirme sa fonction de co-transporteur de saccharose/H⁺. L'ensemble des résultats obtenus permettent de progresser dans la compréhension des mécanismes impliquant le métabolisme glucidique dans le photocontrôle du débourrement.

Mots clés : *Rosa hybrida*, bourgeon végétatif, débourrement, lumière, photocontrôle, saccharose, hexoses, transporteur, flux de sucres.

ABSTRACT

Bud break is a key developmental process controlling plant architecture. Buds are sink organs which require to import sugars to outgrowth. Very little is known about the way this sugars are imported and the role of sugar transporters in this process. In rosebush (*Rosa hybrida*), bud break requires light to occur, even in the absence of correlative inhibitions such as apical dominance. Bud break photocontrol involves a stimulation of sugar metabolism under light, indicating a mobilization of sucrose from the stem. The main goal of this work was to determine the role of sugar transporters in rose bud break photocontrol. *In vitro* experiments showed that rose buds need to import metabolisable sugars (sucrose, glucose or fructose) to outgrowth under light. Supplying buds with these sugars also promote bud break under total darkness (inhibitory condition). After beheading (apical dominance release), assays with radiolabelled sugars showed that bud break photocontrol is correlated with an uptake of hexose and then of sucrose. Furthermore, these uptake require both passive and active components. They could therefore involve symplasmic connections and sugar transporter activity. Phloem sap labelling with a fluorescent tracer demonstrated that dormant bud are not symplasmically connected to the surrounding stem and that connections take place at late stages of bud break. To study the role of sugar transporters into bud break photocontrol we isolated 10 putative sugar transporters (3 for sucrose and 7 for hexose). RT-QPCR analysis suggest that the high affinity sucrose/H⁺ symporter *RhSUC2*, as well the putative hexose transporters *RhSTP1* and *RhTMT2* are involved in bud break photocontrol. Functional validation of *RhSUC2* in yeast expression system confirmed it is a sucrose/H⁺ symporter. All together, results allowed us to get insights of the mechanisms involved in bud break photocontrol by sugar metabolism.

Keywords : *Rosa hybrida*, vegetative bud, bud break, light, photocontrol, sucrose, hexoses, carrier, sugar fluxes.