



Institut Villebon Georges-Charpak, licence sciences et technologie

Rapport de stage

Zaïnaba AHAMADA SOILIH

Etude de la régulation épigénétique des gènes contrôlant le déterminisme du sexe chez *Cucumis melo*.

Stage du 29 avril au 14 juin (7 semaines)

Encadré par Clément PICHOT et Natalia RODRIGUEZ

Enseignant référent : Franck BROUILLARD

Laboratoire : Institut des Sciences des Plantes de Paris Saclay (IPS2) - UMR 9213, UMR
1403

DÉVELOPPEMENT FLORAL ET DÉTERMINISME DU SEXE -Equipe FLOCAD

Licence 3

Sommaire

Remerciements	2
I. Introduction	3
A. Choix du stage	3
B. Le lieu du stage : L'Institut des Sciences des Plantes de Paris-Saclay (Ips2)	3
2. Publication et financement (à trouver)	5
C. Objectif du stage	5
II. Développement	7
A. Contexte scientifique	7
B. L'étude en cours	11
C. Matériels et méthodes	11
1. Le matériel biologique	11
2. Le Génotypage	12
a) L'extraction de l'ADN	13
b) La PCR	14
c) Digestion	16
3. Le phénotypage	18
D. Résultats	18
E. Discussion	24
III. Conclusion	25
Bibliographie	27
Glossaire et abréviations	29
Annexes	30

Remerciements

Je tiens à remercier du fond du cœur toutes les personnes qui m'ont aidée au cours du stage et qui m'ont aidée lors de la rédaction de ce rapport.

Tout d'abord, j'adresse mes remerciements à Franck BROUILLARD notre enseignant encadrant qui a su répondre à mes questions relatives au stage.

Je remercie du fond du coeur Nardjis AMIOUR et Halima MORIN sans qui ce stage n'aurait pas eu lieu et qui m'ont donc donné la possibilité d'intégrer pour sept semaines l'IPS2 (et d'avoir ma licence).

Dans un second temps, je voulais remercier l'équipe FLOCAD et le responsable A.Bendahmane pour leur accueil chaleureux au sein de leur locaux, leur gentillesse et générosité ainsi que leur grande aide quand je faisais mes expériences.

Ensuite, je souhaitais remercier du fond du coeur Souhila Mamouzi avec qui j'ai effectué ce stage de sept semaines avec plaisir et beaucoup de rires !

Pour finir je voudrais remercier mes tuteurs Natalia RODRIGUEZ et Clément PICHOT qui ont pris le temps de m'encadrer et me faire partager un peu de leur passion. Merci à eux qui malgré chacune de mes erreurs étaient toujours présent jusqu'au bout !

I. Introduction

Dans le cadre de la troisième année de licence à l'Institut Villebon Georges Charpak, un stage de fin de formation est demandé. Ainsi, le stage s'effectue au sein de l'Institut des Sciences des Plantes - Paris-Saclay (IPS2) qui a été mis en place en 2015.

A. Choix du stage

Au cours du précédent stage, j'avais suivi pendant quatre semaines Juliette HADCHOUEL et son équipe dont le domaine de recherche était la biologie animale (Hôpital Tenon, néphrologie), les expérimentations étaient effectuées sur des souris. Cependant, dans le cadre de la maturation de mon projet professionnel, cette fois-ci, je souhaitais travailler dans le domaine des plantes, car j'aimerais poursuivre ma formation afin de devenir ingénieur agronome. C'est ainsi que j'ai orienté mon choix vers un stage en laboratoire étudiant la biologie végétale comme à l'IPS2. L'enjeu du stage était donc de développer mes compétences techniques en laboratoire et mes connaissances en biologie végétale.

Au cours des sept semaines du stage, j'ai pu suivre le projet de deux doctorants, Clément Pichot et Natalia Rodriguez en tant que technicienne de laboratoire. Leur sujet est la régulation épigénétique du déterminisme du sexe chez les Cucurbitaceae, utilisant comme organisme modèle, *Cucumis melo* (melon).

B. Le lieu du stage : L'Institut des Sciences des Plantes de Paris-Saclay (Ips2)

L'IPS2 s'appuie sur cinq institutions : les universités Paris-Sud, Evry et Paris-Diderot, le CNRS et l'INRA. (source : université Paris Saclay)

L'INRA est l'Institut national de la recherche agronomique, qui est sous la tutelle du ministère chargé de la Recherche et du ministère chargé de l'Agriculture. Les recherches sont orientées dans le domaine de l'alimentation et du développement durable. L'IPS2 s'appuie donc sur ce principe en axant ses recherches en biologie végétale. Le budget de l'INRA est en 2017 de 850,89 millions, dont 77 % en provenance du ministère chargé de la Recherche, et 20 % de crédits publics (source : INRA).

Les activités de l'IPS2 sont la recherche, l'innovation et la formation. Dans le domaine de la recherche, c'est un institut combinant différentes équipes de recherche travaillant dans les domaines de la biologie moléculaire et cellulaire, et plus précisément; la bio-informatique, la biochimie, la génétique, la physiologie et ainsi que l'epi-génomique. L'IPS2 concentre ses recherches en biologie végétale, l'ambition étant de mieux comprendre les mécanismes qui contrôlent la croissance et le développement de la plante ainsi que sa réaction face à des situations de stress aux facteurs biotique (vivant : oiseaux, mammifères, bactéries...) et aux facteurs abiotique (non - vivant : sol, eau, air ...) (source : IPS2).

L'institut est divisé en trois départements qui sont DGG : département génomique et génétique du développement, DPHYS : département physiologie et signalisation et PMIN : département interactions plantes microorganismes et réseaux. Le directeur de l'institut est M.CRESPI (figure 1) et le responsable de l'équipe dans laquelle est effectué le stage est A. BENDAHMANE. Les équipes sont composées de membres permanents et de membres non-permanent. Les membres permanents de l'équipe sont le directeur de recherche (responsable d'équipe), des chargés de recherche, des ingénieurs de recherche, des ingénieurs d'études, des assistants-ingénieur et des techniciens de recherche. De plus, s'ajoute des membres non-permanents dont les doctorants.

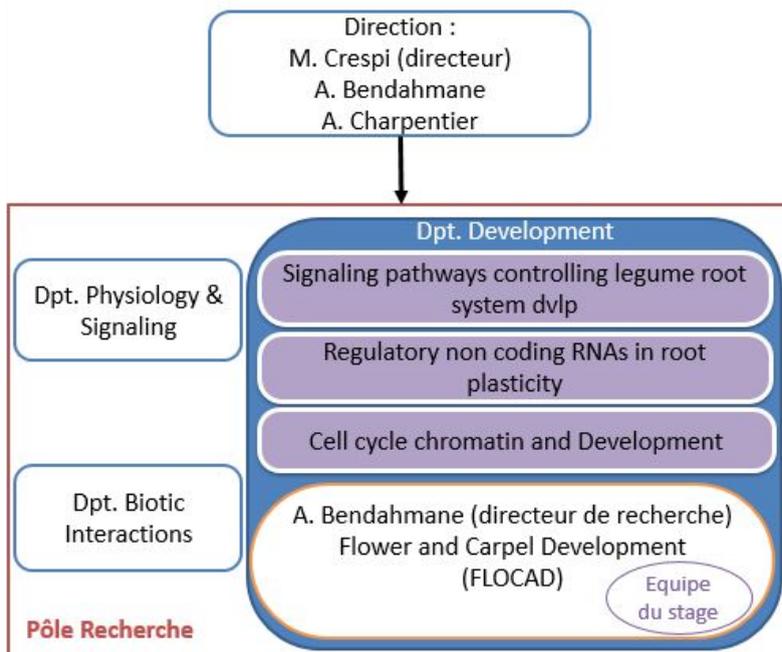


Figure 1 : Schéma de l'organigramme (simplifié) de l'IPS2 (source : IPS2)

2. Publication et financement (à trouver)

L'IPS2 est un grand institut sous la maîtrise de l'INRA, en 2017 l'INRA a publié 4 584 publications scientifiques (source Web Of Science).

L'IPS2 est un institut de recherche publique dont une partie du financement provient de l'état. Cependant, au sein de cet institut, il arrive que certains laboratoires établissent des collaborations avec des entreprises privées qui co-financent certains projets de recherche. Les équipes de l'IPS2 interagissent donc avec des partenaires dans des projets innovants afin de contribuer à l'agriculture de demain.

Les financements de l'IPS2 sont divers, en effet, en plus des subventions de l'état, l'IPS2 possède divers partenaires dans le secteur privé. De plus, possédant des plateformes elle peut alimenter financièrement une partie de ses activités. Les plateformes sont des structures au sein du laboratoire qui répondent à un besoin technique et spécifique (mesures, analyses ...) suite à un règlement monétaire. Ainsi, l'IPS2 possède quatre plateformes interAtome, métabolome et transcriptome et EPITRANS (épigénomique et biologie translationnelle) (source : IPS2).

C. Objectif du stage

Le thème général du laboratoire est "DÉVELOPPEMENT FLORAL ET DÉTERMINISME DU SEXE : comprendre la détermination du sexe et la fructification pour améliorer les cultures." La compréhension de ce processus a des applications concrètes, car le sexe d'une fleur peut limiter sa production. C'est dans cette axe que le sujet de l'étude se concentre sur l'impact de l'épigénétique dans la régulation des gènes contrôlant le déterminisme du sexe.

Le laboratoire a pu mettre en évidence trois gènes jouant un rôle majeur dans l'inhibition du développement des organes sexuelles dans des fleurs de plantes du genre Cucumis.

Le gène M, Andromonoecy (BOUALEM *et al.*, 2008), le gène G, Gynoecy (Martin *et al.*, 2009) et le gène A, Androecy (BOUALEM *et al.*, 2015).

De plus, la détermination du type sexuelle chez les fleurs des plantes de la famille des Cucurbitaceae est dépendante de l'environnement afin de s'adapter aux variations de leur environnement, des mécanismes épigénétique de régulation de l'expression du génome ont été mis en place chez ces plantes au cours de l'évolution. La régulation épigénétique de ces gènes (M, G et A) est encore mal connue.

L'objectif de cette étude est de répondre à cette problématique : Comment comprendre, à l'aide de la génétique inverse, l'impact des acteurs des mécanismes épigénétique de régulation de l'expression des gènes contrôlant le déterminisme sexuel chez le melon ?

Dans un premier temps, sera exposé le contexte scientifique et les précédentes recherches lié autour du sujet, puis sera présenté l'étude en cours. Dans un second temps, le matériel, les techniques et méthodes employées au cours de l'étude afin de répondre à cette problématique seront énoncés. Ensuite, seront présentés les résultats, une interprétation et les discussions, et pour finir une conclusion.

Projet confié et missions suivies :

- Semis des graines
- Extraction d'ADN génomique
- Amplification des régions d'intérêt d'ADNg par PCR
- Génotypage par la méthode dCAPS (digestion enzymatique)
- Phénotypage

II. Développement

Le stage consiste à suivre le projet, le déterminisme du sexe chez des melons mutants. Cette thématique est intéressante en agroalimentaire, car le sexe des plantes est préalable à la fécondation et donc à la formation du fruit. Une plante fécondée produit des fruits (melons, concombres...), ainsi si le sexe des fleurs est contrôlé il serait possible dans l'idéal d'augmenter et contrôler la rentabilité des plantes.

Le stage consiste à suivre le projet d'étude de l'implication de mécanismes épigénétiques par génétique inverse, plus précisément l'utilisation de mutants Tilling (Tilling est la méthode permettant d'obtenir les mutants).

Cette thématique est intéressante en agroalimentaire, car le sexe des plantes est préalable à la fécondation et donc à la formation du fruit. Une plante fécondée produit des fruits, comme par exemple chez la famille des cucurbitaceae, le melon ou le concombre, espèces connues comme étant des plantes à intérêts agronomique dans le marché international plus de 30 millions de fruits produit pour le melon (source: Faostat,2017) . Ainsi l'étude des mécanismes contrôlant le déterminisme, pourrait permettre une meilleure compréhension des processus moléculaires impliqués. Il serait donc plus facile d'entreprendre des projets plus appliqués à l'industrie de l'agroalimentaire, comme par exemple dans l'augmentation de nombre de fleurs, ou bien le choix type sexuels des fleurs et ainsi augmenter la rentabilité des cultures. En effet, des études ont montré que le sexe de la fleur peut être modifié par des facteurs hormonaux et environnementaux, l'éthylène par exemple est un agent féminisant (source : BOUALEM *et al.*, 2015).

A. Contexte scientifique

Les espèces de la famille des Cucurbitacées (concombre, melon, courgette, pastèque, courgettes) présentent une architecture de l'appareil sexuel particulier.

Le melon, plante modèle utilisé dans cette étude, peut présenter différents types sexuels. En effet, chez cette espèce, les fleurs sont initialement bisexuelles jusqu'à la

détermination du sexe au stade des primordiaux du carpelle et des étamines (figure 2) , et fait intervenir l'arrêt sélectif du développement de l'étamine (organe mâle) ou du carpelle (organe femelle) (Latrasse *et. al* 2017).

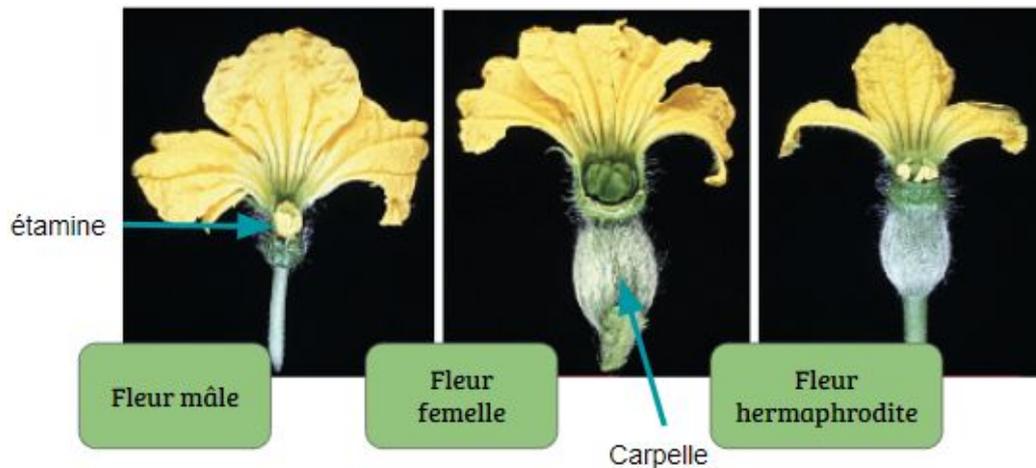


Figure 2 : présentation des fleurs selon le sexe

De plus, il existe chez le melon différentes variétés selon le sexe des fleurs et leurs dispositions au sein de la plante. Les espèces présentant des fleurs mâles et femelles sur la même plante sont dites monoïques, tandis que les variétés dioïques ont des fleurs mâles et femelles séparées en différents individus.

Les plantes gynoïques (figure 3) ne portent que des fleurs pistillées (femelle) et les plantes androïques ne portent que des fleurs staminées (mâle). De plus, certaines variétés combinent les fleurs des deux sexes ainsi la variété andromonoïque présente un phénotype composé de fleurs mâle sur l'axe principal et des fleurs bisexuées sur les axes secondaires. Pour résumer, il est possible d'avoir sur la même plante des combinaisons de fleurs femelles, mâles et hermaphrodite.

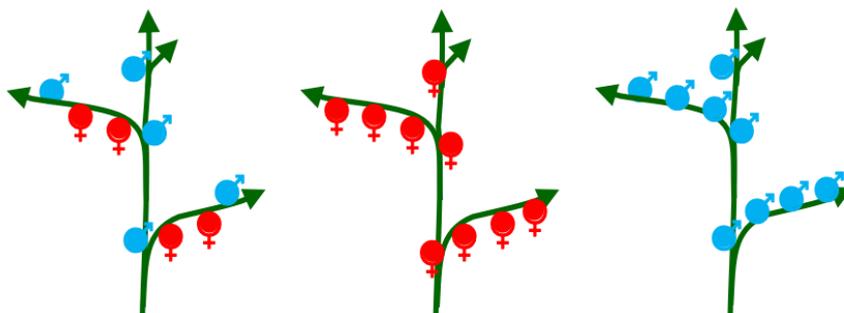


Figure 3 : présentation des différentes variétés de melon selon le sexe (Latrasse et al 2017). La variété de gauche correspond à une monoïque car possédant les deux sexes. Les variétés du milieu et de droite représentent des variétés dioïque (un seule type de fleur), la variété du milieu est gynoïque et celle de droite androïque.

Chez le melon, différents acteurs et particulièrement trois gènes ont pu être mis en évidence andromonoecious (M), gynoecious (G) et androecious (A).

En effet, le gène andromonoecious (M) inhibe le développement du pistil (organe femelle) afin d'avoir une plante sans fleur femelle. (Boualem et al, 2008). Le gène M est quant à lui impliqué dans l'inhibition des étamines, permettant ainsi le développement du carpelle est donc des fleurs femelles.

Le gène A pour finir code une enzyme limitant la vitesse de la synthèse de l'éthylène, la 1-aminocyclopropane-1-carboxylique synthase (ACS) et plus précisément la protéine CmACS11. CmACS11 est un inhibiteur de la protéine codant un facteur de transcription appelé CmWIP1 (figure 4). Ce facteur de transcription en doigt de zinc est codé par le gène G. Cette protéine est impliquée dans l'inhibition de la formation du carpelle (organe femelle). L'expression de CmWIP1 est possible si le gène codant la protéine CmACS11 est inhibée. Pour finir, la protéine appelée CmACS-7 codé par le gène M est aussi connue pour être impliquée dans la vitesse de biosynthèse de l'éthylène (par ACS aussi), elle intervient dans l'inhibition du développement de la formation de l'étamine à des stades précoces (organe mâle) (figure 4). (Latrasse et al. 2017)

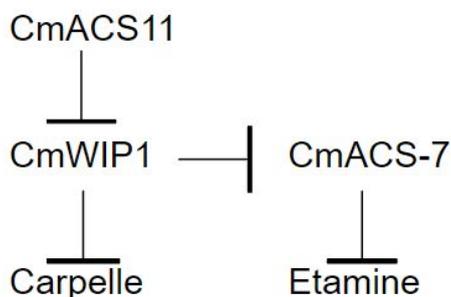


Figure 4 : Schéma du modèle

Les analyses ont donc révélé le modèle suivant (figure 4) dans un premier temps, les fleurs femelles dans un melon de type monoïques sont due à l'expression de ACS-11 qui inhibe l'expression de CmWIP1, l'inhibiteur des carpelles. L'inhibition de CmWIP1 permet à CmACS-7 de s'exprimer et ainsi d'inhiber la formation des étamines. Dans un second temps, les fleurs mâles n'expriment pas le gène de la CmACS-11, leur développement est lié à l'expression de CmWIP1 qui inhibe l'expression du développement des carpelles et induit la formation des étamines en inhibant CmACS-7

Les précédentes études suggèrent un modèle (figure 4) dans lequel ces gènes interagissent pour contrôler le développement des fleurs mâles, femelles et hermaphrodites chez le melon. (Boualem *et al.*,2015)

La détermination du sexe chez le melon et les autres cucurbitacées est influencée par la combinaison de différents facteurs environnementaux tels que la lumière, l'humidité et la température. La plante peut intégrer à la fois des indices internes et externes et donner naissance à un phénotype sexuel qui implique potentiellement des mécanismes épigénétiques de régulation de l'expression sexuelle. Ces régulations épigénétiques peuvent être des méthylations de l'ADN, des modifications de l'histone par exemple. Les modifications de la chromatine peuvent amener à l'activation de la transcription de d'un gène comme par l'acétylation de l'histone ou par son inhibition comme par des marqueurs H3K27Me1 et H3K27Me3.

Par exemple, les protéines du groupe Polycomb (Pcg) bien conservées des plantes aux animaux sont des régulateurs impliqués dans le contrôle du développement, ces protéines sont PCR1 et PCR2 (Polycomb complexe répressif (Figure 5) . Ces protéines sont clés en épigénétique, car seraient responsable de la répression de gènes par des modifications covalentes des protéines d'histone notamment l'histone H3 Lys 27 (H3K27), méthylation par PRC2 et histone H2A par ubiquitination de PRC1 (Margueron & Reinberg, 2011; Schatlowski et al., 2008; Kim & Sung 2014). C'est une modification post-traductionnelle des histones qui contrôle l'expression des gènes du développement.

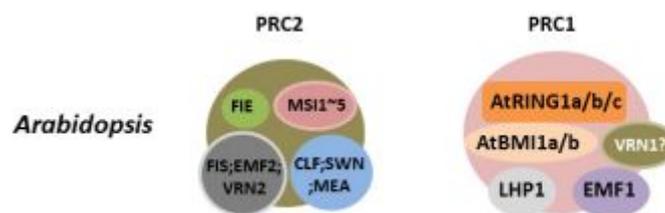


Figure 5: Illustrations des complexes PRC1 et PRC2 chez Arabidopsis. Le complexe PRC1 (à droite) est composé des complexes AtRINGa/b/c, atBMI1a/b, LHP1, AMF1 et VRN1. Le polycomplexe PRC2 est composé de 4 complexes (FIE, MSI-5, FIS ;EMF2 ;VRN2 et CLF ;SWN ;MEA) (Kim & Sung (2014))

Les différentes mutations caractérisées au cours de ce projet portent donc sur la protéine “Curly Leaf” (CLF) du complexe PCR2. En effet, il est probable que le complexe polycomb

soit impliqué dans le déterminisme sexuel. Les mutants CLF, chez arabidopsis, présentent un phénotype avec une altération de la floraison (Henning *et al.*,(2009)), ainsi il est possible d'avoir des sépales porteur d'ovules ainsi ils perdent leur structure de base.

Par ailleurs, dans une étude réalisée auparavant par le laboratoire, il a été montré que le dépôt de cette marque est sexe-spécifique et permet la régulation des gènes intervenant dans le déterminisme du sexe. (Latrasse *et al.*,2017)

B. L'étude en cours

L'objectif est de comprendre les mécanismes épigénétiques qui contrôlent la détermination du sexe chez les melon. C'est ainsi que des lignées de melon ont été caractérisées et développées, en effet elles ont été mutagénéisées par EMS (Dahmani-mardas *et al.*2010). L'éthane-sulfonate d'éthyle, EMS, est une substance mutagène qui produit des mutations génétiques aléatoires. Au cours du projet, l'intérêt est porté aux familles possédant différents types de mutations (stop, non-sens) dans les gènes codant pour le complexe PRC2. Dans le cas du projet la protéine étudiée est CURLY LEAF (CLF), une protéine du complexe PRC2 qui est l'unité catalytique du complexe et la protéine déposant la marque épigénétique.

C. Matériels et méthodes

1. Le matériel biologique

Les lignées de melons utilisées au cours de cette étude sont issues de la lignée melon charentais (*Cucumis melo* var. *cantalupensis*), qui à la capacité de former des fleurs mâles, femelles et hermaphrodite (monoecious) (Dahmani-mardas *et al.*, 2010). L'étude est réalisée sur cinq familles chaque famille possède une mutation spécifique et les résultats sont comparés à un contrôle qui est le melon charentais de référence ne possédant pas de mutations pour le gène codant la protéine d'intérêt (mais possiblement d'autres mutations dans le génome). Les mutations, selon les familles, se situent à différentes positions dans la structure du gène exprimant CLF. Celles-ci sont des mutations faux-sens (mutation ponctuelle dont un nucléotide est changé et qui ne conduit pas à un codon-stop). Ces familles ont été sélectionnées auparavant selon la potentielle altération conférée par le type de mutations. En

effet, après mutations par EMS et séquençage, des PCRs sont effectuées sur le gène cible afin de cibler le type de mutation. Les familles se nomment 3800, 340, 5907 et 435. Chaque plante est définie selon sa famille, l'année à laquelle a été générée la famille et son numéro dans le lot. Les graines de melon sont semées dans un terreau de plantation (figure 6) et poussent selon les conditions suivantes, 16h de lumière (6h à 22h) avec 27°C en journée et 21°C en nuit et une humidité de 60%.



Figure 6 : photographie des différents stades de développement, avant extraction de l'ADN à partir de la feuille. A: premiers cotylédons qui sortent suite au semis de la graine. B : Pousse de la tige. C: Premières feuilles avec lesquelles on peut commencer à échantillonner pour le génotypage. D: Pousse de la feuille qui s'élargit au cours du temps avec la pousse de la plante. Les premières vrilles sont visibles (organe de fixation).

2. Le Génotypage

Le génotypage est le mécanisme qui permet, à partir d'un extrait d'ADN, de déterminer la composition génétique de la plante. Il existe différentes techniques pour effectuer un génotypage par exemple le séquençage Sanger ou la dCaps (derived Cleaved

Amplified polymorphic Sequences). La technique utilisée doit être la plus économique possible tout en ayant des résultats fiables, dCaps répond à ces critères.

a) L'extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN est une technique permettant d'isoler l'ADN issue des cellules de la plante. L'ADN ainsi extrait peut ensuite être utilisé pour des recherches de biologie moléculaire, comme le séquençage ou la PCR.

Avant d'effectuer le génotypage il est donc nécessaire de faire une extraction de l'ADN, une dizaine de disques de feuilles est récoltée à l'emporte pièce 5 mm (figure 7) pour chaque plante.



Figure 7 : photographie d'une feuille dont des cercles ont été prélevés afin d'y extraire de l'ADN.

Les extraits de la plante sont ensuite mis dans un lyophilisateur qui permet de les deshydrater à froid pendant une nuit.

Les disques extraits de la plante sont ensuite broyés à l'aide d'un broyeur - mélangeur à la fréquence 20 Hz pendant 2 min afin de lyser les cellules et rompre la paroi cellulaire et la membrane des cellules . L'élimination des protéines et des acides nucléiques (ARN...) est effectué à l'aide du Kit DNeasy de QIAGEN. Ces éliminations sont utiles afin d'avoir au final de l'ADN purifié en majorité, l'ADN est concentré par une précipitation à l'alcool. Il existe des méthodes alternatives afin d'extraire de l'ADN comme par CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) mais il existe un risque de contamination par de l'ARN.

Afin de confirmer la bonne extraction de l'ADN il est possible de visualiser le résultat. La migration du produit est faite sur un gel d'agarose (1.5 % soit 1.5 g d'agarose pour 100 mL de tampon Tris Borate EDTA (TBE 1X)). Des bandes sur le gel sont visibles après migration sur le gel d'agarose contenant un intercalant de l'ADN (BET). Cet intercalant a pour rôle de s'incorporer dans l'ADN et d'émettre une fluorescence.

b) La PCR

Après l'extraction de l'ADN il faut effectuer une PCR (figure 8), réaction en chaîne par polymérase (PCR : polymerase chain reaction). C'est une technique de biologie moléculaire d'amplification génique. Elle permet de multiplier une séquence d'ADN connue à partir d'une faible quantité. Les étapes de la PCR sont la dénaturation (chauffage pour séparer les brins), l'hybridation et l'élongation (température où l'enzyme est active et polymérise).

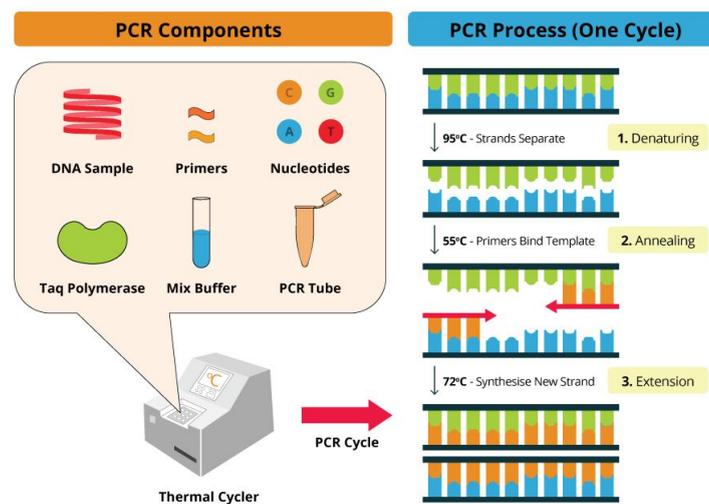


Figure 8 : schéma de la PCR (source: THE science INFO). Les étapes de la PCR sont la dénaturation (chauffage pour séparer les brins), l'hybridation et l'élongation (température où l'enzyme est active et polymérise).

Le mix est un mélange composé de l'ADN, d'amorces / primers, de nucléotides, de polymérase thermorésistante (Taq polymérase) et d'un tampon.

Pour un échantillon (23 μ L) :

- 2.5 μ L Buffer PCR 10X

- 1 μ L d'amorce For
- 1 μ L d'amorce REV
- 1 μ L dNTP
- 1 μ L de TAQ
- 16.5 μ L H₂O
- 2 μ L ADN

Les amorces For et Rev sont spécifiques à la famille sur qui est effectué la PCR.

Programme des cycles de la PCR :

- 5 min à 94 °C
- 35 cycles avec
 - 10 s à 94°C
 - 15s à 55°C
 - 1 min à 72°C
- 5 min à 72 °C
- attente à 4°C

La technique utilisée est dCaps (figure 9) (Séquences Polymorphiques Amplifiées Clivées Dérivées : dCAPS). Cette technique est utile pour le génotypage de mutations connues. C'est au cours d'une PCR qu'est inséré un site de restriction pour permettre une digestion par des enzymes de restriction. Les produits de PCR seront révélés par électrophorèse sur un gel d'agarose standard.

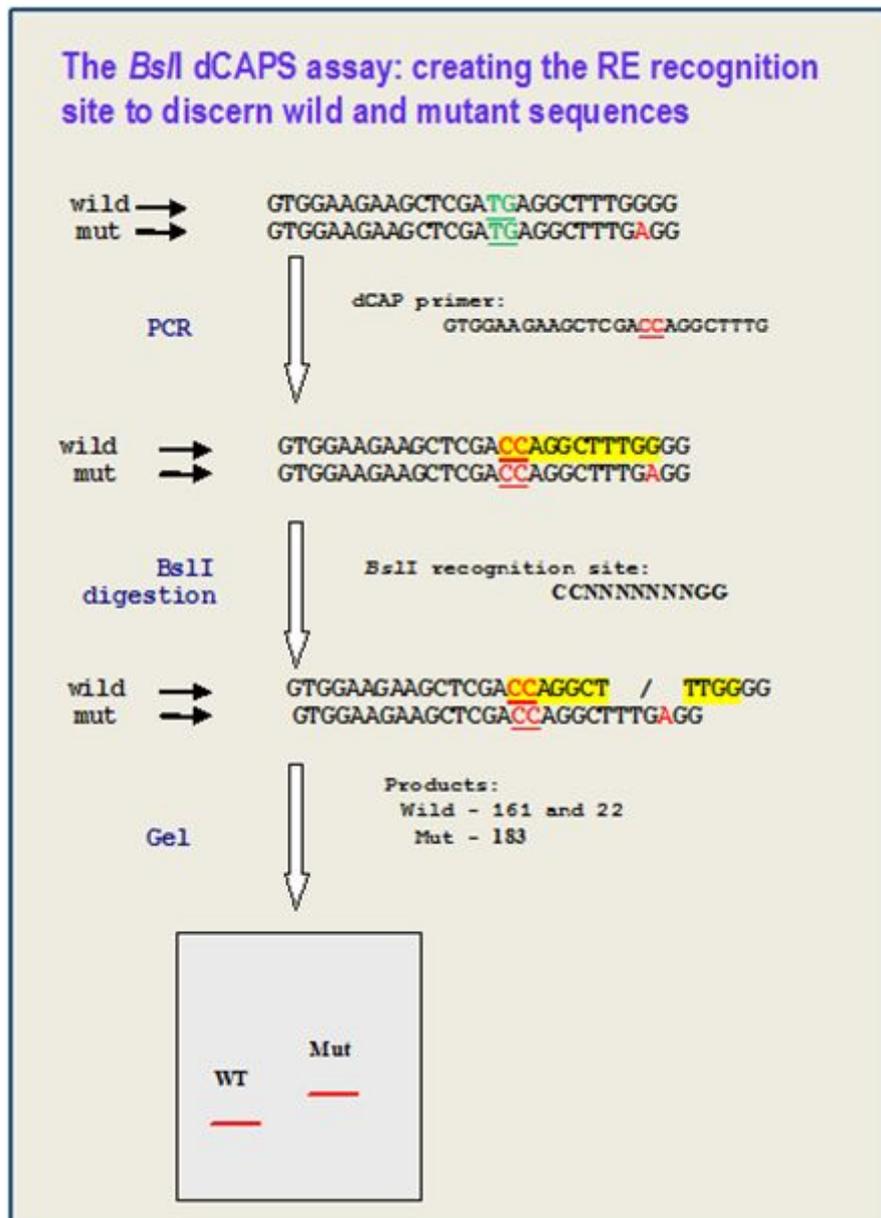


Figure 9 : Schéma illustrant la technique dCaps. (source NCBI: National Center for Biotechnology Information) La première étape consiste à insérer au cours d'une PCR une site de restriction qui pourra au cours de la seconde étape (la digestion) être coupé selon la séquence. Dans le schéma la coupure du gène sauvage fait apparaître deux bandes une à 161 pb et l'autre à 22 pb (non visible sur le schéma) tandis que le gène mutant n'est pas coupé ainsi apparaît une unique bande à 183 pb

c) Digestion

Le produit de PCR modifié est soumis à une digestion par une enzyme de restriction (figure 10 et annexe).

La taille et le nombre de bandes nous permet donc de déterminer si c'est un mutant (Wild type = Wt), un sauvage ou un hétérozygote pour le gène étudié.

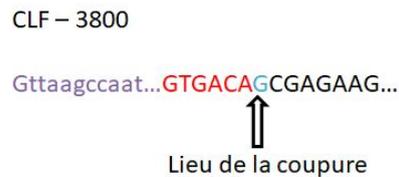


Figure 10: Schéma du site de restriction de la famille 3800 qui permet de déterminer la nature de la plante. Ce site de restriction est préalablement établi et l'enzyme utilisé au cours de la digestion lui est spécifique.

Protocole pour la digestion d'une famille :

Pour 1 échantillon :

- 7 µL de produit PCR
- 1 µL de l'enzyme
- 1 µL de tampon (Cutsmart)
- 0.1 µL BSA
- 0.9 µL H₂O

L'échantillon est ensuite incubé toute la nuit à 37°C.

Les enzymes sont spécifiques aux familles, l'enzyme *MobI* est destiné à la famille 340 tandis que l'enzyme *BfaI* est utilisé pour les familles 5907 et 435 et les familles 380 et 7212 sont digérées avec l'enzyme *HinfI*. La révélation de la digestion s'effectue dans un gel d'agarose à 3 %, la migration est à 130V pour 40 min. C'est au cours de la révélation de la digestion que l'on sait si la plante est mutante, hétérozygote ou sauvage pour le gène étudié.

L'étape suivante consiste à déterminer plus tard le phénotype de la plante lors de la floraison.

3. Le phénotypage

Suite au génotypage, des plantes sont sélectionnées afin d'être mises "en pot" pour qu'ils puissent pousser dans des meilleures conditions et atteindre la floraison.

Ainsi, elles sont disposées en serre et sous la lumière naturelle. Les plantes possèdent dans ces nouvelles serres un espace plus grand favorable à leur pousse en longueur et ainsi éviter le stress car si une plante stress il est possible que le sexe de ses fleurs soit régi par le stress. Au cours du phénotypage d'une plante est observé son aspect global (par exemple sa longueur et épaisseur).

De plus, la position spécifique des fleurs sur les ramifications et le type sexuel (figure 11) sera ensuite étudiée afin de déterminer le sexe de la plante et donc l'effet de la mutation sur celle-ci.



Figure 11 : Fleurs de melon

D. Résultats

Les plantes sont extraites et répertoriées selon un tableau (tableau 1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	EMS 6907 #1 HMZ mut 2018SH285,	EMS3800 #3 Mut 2018SK231,	EMS3800 HET 2018SK233,	EMS3800 HET 2018SK233,	EMS 5907 #2 M3 seg 2018SK287,	EMS 5907 #10 M3 seg 2018SK287,	EMS 0435 WT 2018SK227,	EMS 0340 #4 HET 2018SH277	EMS0340 #1 seg pop 2006AA385,	EMS0340 #9 seg pop 2006AA385,	EMS 7212 #5 M3 seg pop 2018SK237,	Ch. Mono #2
B	EMS 6907 #2 HMZ mut 2018SH285,	EMS3800 #4 Mut 2018SK231,	EMS3800 HET 2018SK233,	EMS3800 #1 WT 2018SK234,	EMS 5907 #3 M3 seg 2018SK287,	EMS 5907 #11 M3 seg 2018SK287,	EMS 0435 WT 2018SK227,	EMS 0340 #5 HET 2018SH277	EMS0340 #2 seg pop 2006AA385,	EMS0340 seg pop 2006AA385,	EMS 7212 #6 M3 seg pop 2018SK237,	Ch. Mono #3
C	EMS 6907 #3 HMZ mut 2018SH285,	EMS3800 #5 Mut 2018SK231,	EMS3800 HET 2018SK233,	EMS3800 #2 WT 2018SK234,	EMS 5907 #4 M3 seg 2018SK287,	EMS 5907 #12 M3 seg 2018SK287,	EMS 0340 #1 Mut 2018SH75	EMS 0340 #6 HET 2018SH277	EMS0340 #3 seg pop 2006AA385,	EMS0340 #11 seg pop 2006AA385,	EMS 7212 #11 M3 seg pop 2018SK237,	Ch. Mono #4
D	EMS 6907 #4 HMZ mut 2018SH285,	EMS3800 #1 HET 2018SK233,	EMS3800 HET 2018SK233,	EMS3800 #3 WT 2018SK234,	EMS 5907 #5 M3 seg 2018SK287,	EMS 5907 #13 M3 seg 2018SK287,	EMS 0340 Mut 2018SH75	EMS 0340 #7 HET 2018SH277	EMS0340 #4 seg pop 2006AA385,	EMS0340 seg pop 2006AA385,	EMS 7212 #2 M3 mut 2018SK235	
E	EMS 6907 #5 HMZ mut 2018SH285,	EMS3800 #2 HET 2018SK233,	EMS3800 HET 2018SK233,	EMS3800 #4 WT 2018SK234,	EMS 5907 #6 M3 seg 2018SK287,	EMS 0435 #4 HET 2018SK225,	EMS 0340 Mut 2018SH275	EMS 0340 #8 HET 2018SH277	EMS0340 #5 seg pop 2006AA385,	EMS 7212 #1 M3 seg pop 2018SK237,	EMS 2710 #1 Andro	
F	EMS 6907 #6 HMZ mut 2018SH285,	EMS3800 #3 HET 2018SK233,	EMS3800 HET 2018SK233,	EMS3800 #5 WT 2018SK234,	EMS 5907 #7 M3 seg 2018SK287,	EMS 0435 #5 HET 2018SK225,	EMS 0340 #1 HET 2018SH277	EMS 0340 #9 HET 2018SH277	EMS0340 #6 seg pop 2006AA385,	EMS 7212 #2 M3 seg pop 2018SK237,	EMS 2710 #2 Andro	
G	EMS3800 #1 Mut 2018SK231	EMS3800 #4 HET 2018SK233,	EMS3800 HET 2018SK233,	EMS3800 #6 WT 2018SK234,	EMS 5907 #8 M3 seg 2018SK287,	EMS 0435 #6 HET 2018SK225,	EMS 0340 HET 2018SH277	EMS 0340 #10 HET 2018SH277	EMS0340 #7 seg pop 2006AA385,	EMS 7212 #3 M3 seg pop 2018SK237,	EMS 2710 #3 Andro	
H	EMS3800 #2 Mut 2018SK231	EMS3800 #5 HET 2018SK233,	EMS3800 HET 2018SK233,	EMS 5907 #1 M3 seg 2018SK287	EMS 5907 #9 M3 seg 2018SK287	EMS 0435 #1 WT 2018SK227,	EMS 0340 HET 2018SH277	EMS 0340 #11 HET 2018SH277	EMS0340 #8 seg pop 2006AA385,	EMS 7212 #4 M3 seg pop 2018SK237	Ch. Mono #1	

Tableau 1 : Plan des plantes récoltées, y est inscrit la famille (numéro de série) et si elle est issue d'un melon qui était WT (sauvage), HET (hétérozygote) ou MUT (mutant). Les couleurs suivent ce schéma : la famille 5907 est en vert, la famille 340 en violet, la famille 435 en orange, la famille 380 en noir, et la famille 7212 en rouge. La famille en blanche représente les melons issus de la famille Andromonoïque, et en bleu la famille monoïque (melon de référence).

Le gel obtenu suite à l'extraction de l'ADN nous confirme si la méthode a bien fonctionné (figure 11), s'il n'y aucune bande alors on peut supposer que l'ADN n'est pas correctement extraite. On observe que pour chaque puits une bande est visible, ainsi on peut confirmer que l'ADN de la plante a correctement été extrait. Suite à l'extraction de l'ADN une PCR est effectuée.

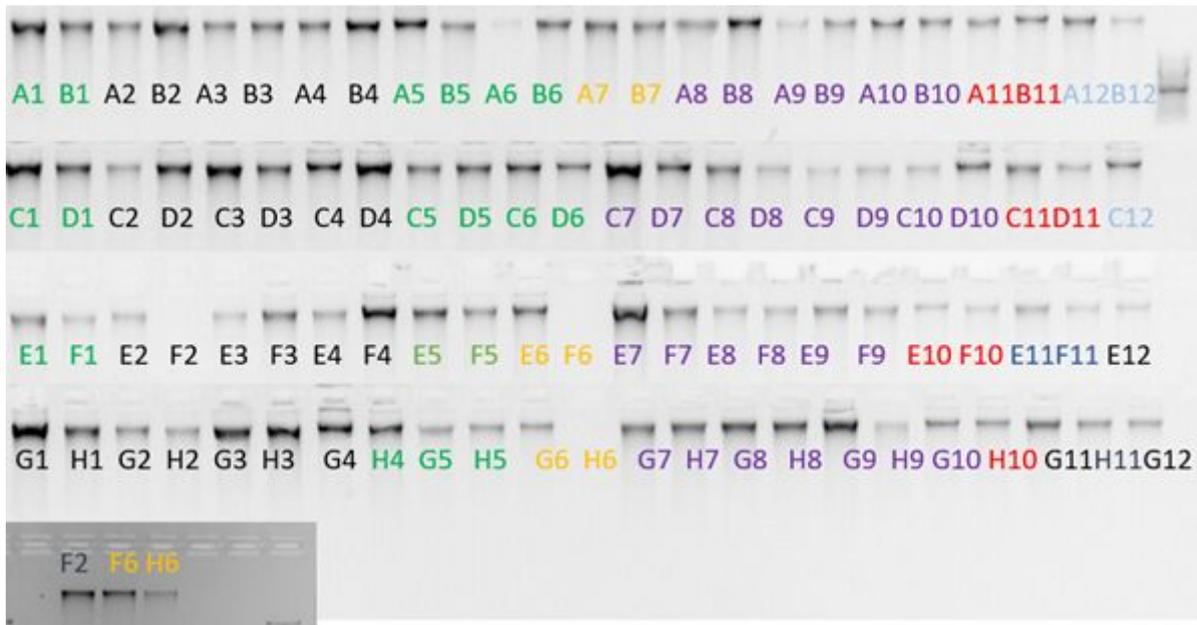


Figure 12: Photographie des révélations des extractions d'ADN sur un gel agarose (voir tableau 1) les familles sont selon les couleurs suivantes : la famille 5907 est en vert la famille 340 en violet la famille 435 en orange la famille 380 en noir et la famille 7212 en rouge

En effet, une séquence connue de l'ADN extrait est amplifiée. Les résultats révélés sur un gel d'agarose à 1.5 % montrent si l'amplification est bonne. Les fragments possèdent une taille déterminée ainsi selon la famille la bande sera différente. Par exemple, (figure 12) on observe pour la famille 3800, (A2-B2-A3-B3-A4-B4, croix en noir) la bande se situe à 331 pb tandis que pour la famille 5907 (A1-B1-A5-B5, croix en rouge) la bande se situe à 269 pb.

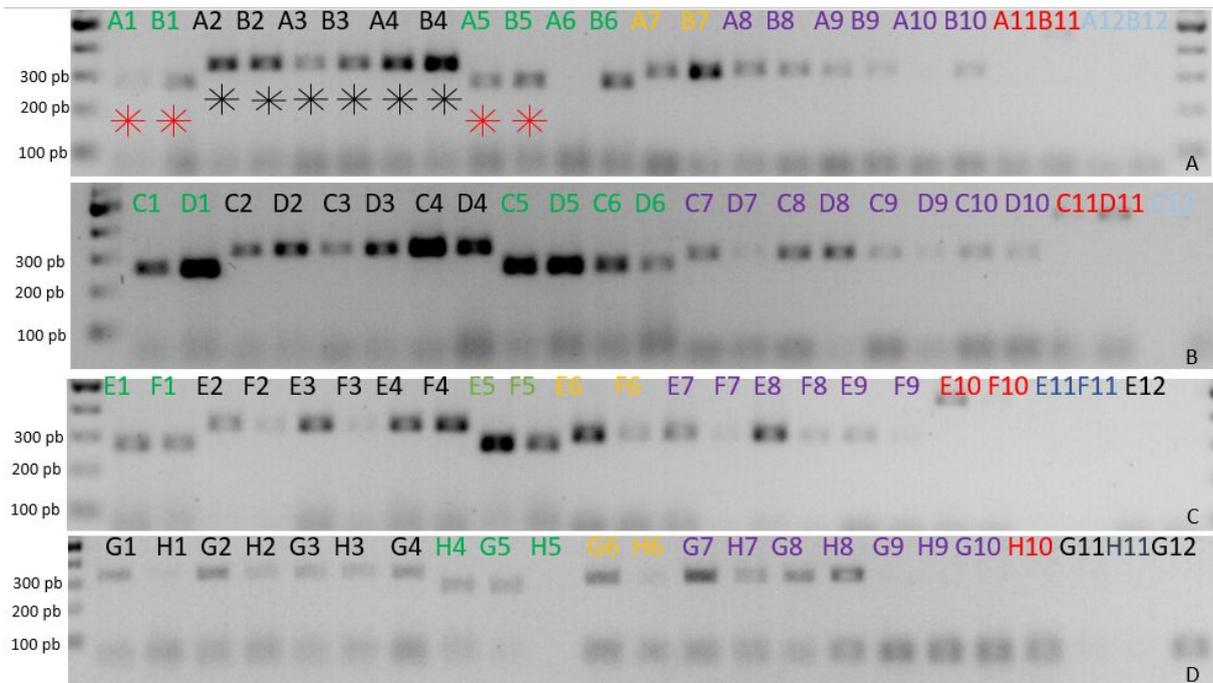


Figure 12 : révélation sur un gel d'agarose (1.5 % à 130 V) de la PCR : la famille 5907 est en vert la famille 340 en violet la famille 435 en orange la famille 380 en noir et la famille 7212 en rouge. Se situe à gauche une échelle 100 pb .

Les résultats de la PCR sont cohérents avec les résultats attendus en effet, avant digestion, chaque famille possède une bande spécifique (Tableau 2).

Famille	435 :	5907 :	340 :	380 :	7212 :
Bande(s) observable (en pb)	WT : 32+271 MUT : 303	WT : 240+29 MUT : 269	WT : 139+170 MUT : 309	WT : 222 + 109 MUT : 331	WT : 319 + 132 MUT : 451

Tableau 2 : Listes des bandes attendus. Suite à la PCR il est attendu pour chaque famille une bande qui lui est spécifique. Après la digestion est obtenu une, deux ou trois bandes selon la plante et son identité génétique (qui seront révélées par une exposition aux UV d'un gel d'agarose contenant du BET).

La digestion suit la PCR. Le résultat est observable après révélation avec un gel à 3 %. On observe (figure 13) par exemple que bien que les plantes B2 et B3 (avec des croix en noir) soient de la même famille (3800) (qui a été confirmé par la PCR précédente), elles ne possèdent pas la même combinaison d'allèle pour ce gène. En effet, la plante B2 possède deux

copies de l'allèle mutant de CLF (mutant homozygote) alors que B3 est hétérozygote pour la mutation puisqu'il possède l'allèle sauvage pour un chromosome et l'allèle mutant sur l'autre. Ils n'ont pas le même génotype pour le gène codant la protéine CLF à la position étudiée (Figure 13 et tableau 2).

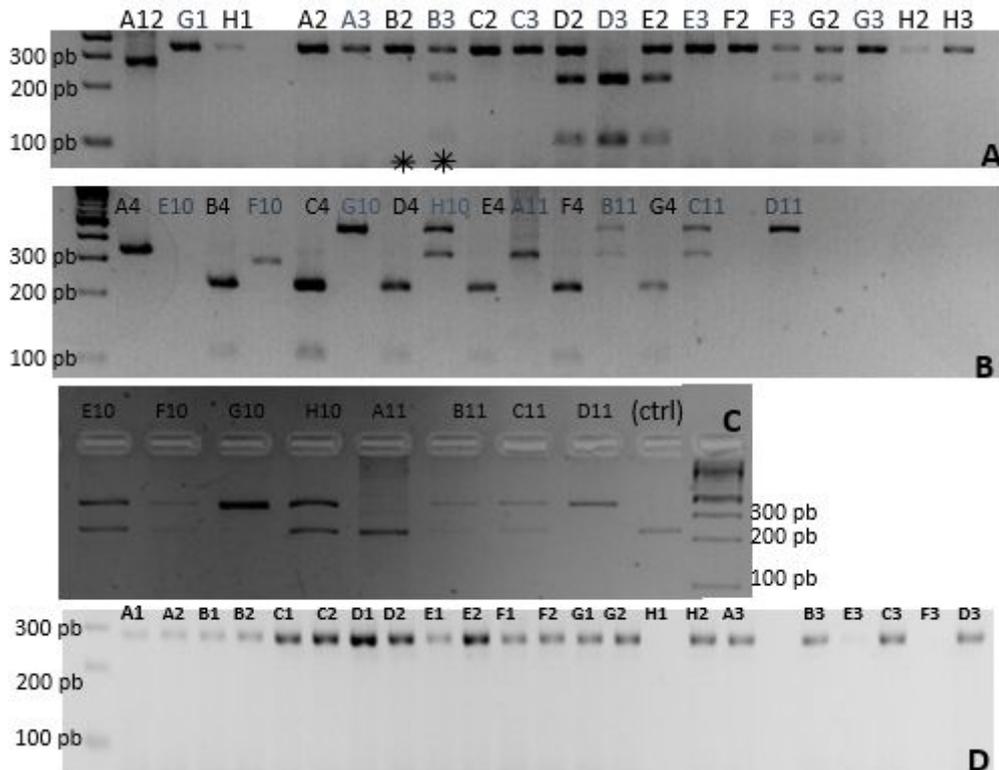


Figure 13 : Révélation aux UV d'une digestion sur un gel à 3 % d'agarose (incorporé de BET). Se situe à gauche une échelle 100 pb. Pour chaque famille est effectué aussi un contrôle positif (la plante sauvage) et un contrôle négatif (pas d'ADN). Les croix en noir (A) symbolisent les plantes B2 (plante 4 de la famille mut 380) et B3 (plante 7 de la famille het 380)

Ainsi, la plante B2 révèle une unique bande à 331 pb ce qui est caractéristique (figure A. 13) des mutants (homozygote) tandis que la plante B3 révèle trois bandes à 331 pb, 222 pb et 109 pb, c'est donc un hétérozygote car il possède les bandes à la taille des produits PCR attendus spécifiques des allèles mutant et sauvage. C'est au cours de cette étape que nous pouvons génotyper la population semée. (tableau 3)

	1	2	3	4	7	8	9	10
A		Mut	Mut	Mut		Het	Mut	Het
B		Mut	Het	Wt		Het	Wt	Het
C		Mut	Mut		Mut	Wt	Wt	Wt
D		Het	Wt		Mut	Het	Mut	Mut
E		Het	Mut		Mut	Het	Wt	
F		Mut	Het		Mut	Het	Het	
G	Mut	Het	Mut		Het	Het	Wt	
H	Mut	Mut	Mut		Wt		Het	

Tableau 3 : tableau récapitulatif (incomplet) du génotype des plantes déterminé suite à la digestion.

Au cours du phénotypage, il est possible de savoir le type sexuel de la fleur. La position de chaque fleurs des ramifications et de la tige principales sont étudiée. À partir du sexe des fleurs et de leur dispositions il est possible d'en déduire de quel type est la plante.

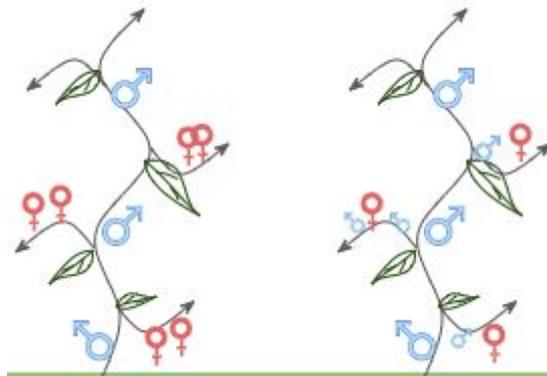


Figure 15 : Schéma d'une plante monoécieuse (à gauche) et la plante que l'on s'attend à observer (à droite) (schéma inspiré de l'article BOUALEM et al., 2015) Les plantes possèdent sur leur axe principales des fleurs mâles, la plante monoécieuse possède dans son axe secondaire comme première fleur une femelle tandis que la plante de droite possède une fleur mâle.

De plus, avec le génotypage la mutation de la plante est connue, il est possible d'émettre des hypothèses concernant le lien entre une mutation et le sexe d'une plante. Il est aussi possible d'observer des différences morphologique par exemple (figure 16) la plante A semble plus petite et moins développé (de feuilles moins larges et nombreuses) que la plante B.

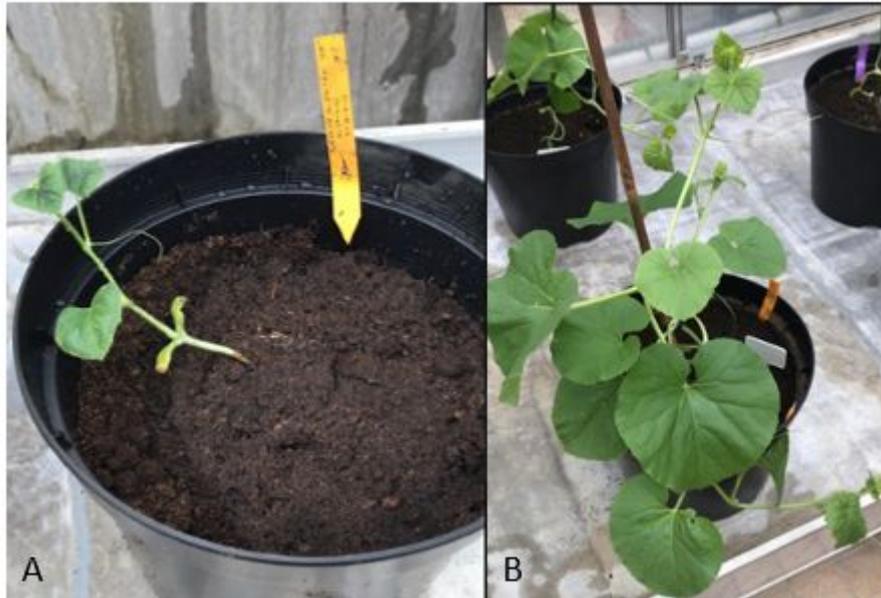


Figure 16 : Photographie des plantes E8 (plante n°8 de la famille Het 340) à gauche (A) et F4 (pl 5 de la famille Wt 3800) à droite (B). Les plantes ont été sémis à la même période et ont poussée dans les mêmes conditions.

E. Discussion

Les différentes techniques émis plus haut dans le rapport permettent de confirmer la mutation (génotypage) d'une plante et d'ensuite par l'analyse de son phénotype (phénotypage) de déterminer le sexe des fleurs et donc le type de la plante. Il s'agit donc d'une génétique inverse. Au cours de l'étude, le phénotypage complet (manque de temps) n'était pas possible cependant des différences morphologique selon les familles étaient déjà observable. De plus, on peut supposer que dans les plantes étudiées, comme WIP1 n'est plus inhibé, il est possible qu'il y ait une inhibition du carpelle des fleurs femelles. Ainsi le phénotype attendu serait avec des fleurs mâles plus nombreuses que des fleurs femelles, le ratio fleur mâle/femelle augmenterait.

Cependant, il faut être conscient que cette étude doit être répétée plusieurs fois afin de confirmer que le phénotype correspond bien à l'expression du gène.

Il est essentiel de vérifier que le phénotype observé est propre à la mutation sur le gène d'intérêt, en effet, il est possible que la famille possède en plus d'une mutation sur ce gène des mutations sur d'autres gènes. Il faut donc phénotyper des hétérozygotes, des mutants, des sauvages (Wild type) au gène d'intérêt et des plantes complètement sauvage.

L'étape suivante serait de tester des plantes possédant d'autres mutations du complexe étudié (SWN, MEA) afin de comprendre l'effet complet du complexe sur le déterminisme du sexe chez le melon.

III. Conclusion

La finalité de ce projet serait donc de comprendre le déterminisme sexuel d'une plante et le lien avec son support génétique. Nous avons déjà observé au cours de l'étude que la mutation n'est pas létal en effet les plantes poussent. De plus, un phénotype est observable ainsi, la mutation fait bel et bien un effet.

La compréhension de ce mécanisme pourrait s'étendre sur de nouvelles espèces. En effet, la compréhension complète du mécanisme de floraison peut-être réellement utile dans le domaine de l'agro-alimentaire. La famille des *Curcubitaceae* dont le melon appartient représente plus de 230 millions de fruit produit en 2017 dans le monde (31 millions de melons, 118 pastèque, 83 concombre ...) (source : faostat)

Dans un second temps, au cours du stage en laboratoire j'ai eu la chance et la possibilité d'améliorer mes connaissances en plantes sur des axes différents dont la technique et le théorique. De plus, ce fut ma première expérience dans le domaine du végétal, ce qui rentre dans l'objectif de mon ambition d'étude. Ce stage confirme mon envie personnelle de travailler dans l'amélioration des techniques en agroalimentaire et la recherche de l'innovation.

Les techniques, dont j'ai eu la chance suite à ma formation, d'appliquer de manière presque indépendante nécessitent de la rigueur (PCR, extraction ADN...), il faut quelquefois les répéter plusieurs fois. J'ai donc dû améliorer mes méthodes et compétences afin d'être plus efficace, pour travailler plus rapidement, en gérant plus d'échantillons et tout en ayant au final des résultats de bonnes qualités.

En outre, j'ai eu la possibilité de mobiliser mes compétences transverses comme la communication écrite avec le rapport de stage, l'étude préalable de bibliographie ainsi que la restitution de mes connaissances pour comprendre l'étude. J'ai aussi eu à travailler au sein

d'une équipe avec différentes personnes, formateurs, voisins et communiquer avec eux quelquefois en anglais et j'ai eu à demander de l'aide en cas de doutes ou problèmes.

Je peux ajouter que à chaque résultats non fonctionnel il a fallu trouver les causes et établir des solutions alternatives (recommencer en changeant le protocole, être plus rapide ...) ce qui illustre une adaptabilité.

Pour finir, le laboratoire de recherche répond aux questions et problématiques de notre monde avec une ambiance chaleureuse et humaine. Cette ambiance qui est un plus majeur ne se retrouve pas forcément dans les entreprises classiques (Wavestone, Banque), les personnalités des gens sont visibles et sont une force dans le domaine de la recherche. Le laboratoire de recherche possède une ambition et un sujet passionnant dont les réponses sont importantes pour l'avenir. J'en conclus que pour ma perspective de carrière je souhaiterais travailler dans l'étape suivante, l'application des découvertes dans le domaine de l'agro-alimentaire.

Bibliographie

Piferrer, F. (2013). Epigenetics of sex determination and gonadogenesis. *Developmental Dynamics*, 242(4), 360-370.

Barrett, S. C. (2002). Evolution of sex: the evolution of plant sexual diversity. *Nature reviews genetics*, 3(4), 274.

Kim, D. H., & Sung, S. (2014). Polycomb-mediated gene silencing in *Arabidopsis thaliana*. *Molecules and cells*, 37(12), 841.

Boualem, A., Fergany, M., Fernandez, R., Troadec, C., Martin, A., Morin, H., ... & Purugganan, M. D. (2008). A conserved mutation in an ethylene biosynthesis enzyme leads to andromonoecy in melons. *Science*, 321(5890), 836-838.

Boualem, A., Troadec, C., Camps, C., Lemhemdi, A., Morin, H., Sari, M. A., ... & Bendahmane, A. (2015). A cucurbit androecy gene reveals how unisexual flowers develop and dioecy emerges. *Science*, 350(6261), 688-691.

Latrasse, D., Rodriguez-Granados, N. Y., Veluchamy, A., Mariappan, K. G., Bevilacqua, C., Crapart, N., ... & Boualem, A. (2017). The quest for epigenetic regulation underlying unisexual flower development in *Cucumis melo*. *Epigenetics & chromatin*, 10(1), 22.

Dahmani-Mardas, F., Troadec, C., Boualem, A., Leve[^]que, S., Alsadon, A. A., Aldoss, A. A., ... & Bendahmane, A. (2010). Engineering melon plants with improved fruit shelf life using the TILLING approach. *PloS one*, 5(12), e15776.

Ming, R., Bendahmane, A., & Renner, S. S. (2011). Sex chromosomes in land plants. *Annual review of plant biology*, 62, 485-514.

<http://institut.inra.fr/Reperes/Chiffres> - INRA. *Les chiffres clés* [consulté le 12/06/2019]. Disponible.

<https://www.universite-paris-saclay.fr/fr/recherche/laboratoire/institut-des-sciences-des-plantes-de-paris-saclay-ips2> - UNIVERSITE PARIS-SACLAY. *Institut des Sciences de Paris-Saclay (IPS2)* [consulté le 12/06/2019]. Disponible.

<http://ips2.u-psud.fr/fr/test/l-institut-1.html> - IPS2. *Présentation de l'institut des sciences des plantes-paris-saclay* [consulté le 12/06/2019]. Disponible.

Shailesh Koirala <http://thescienceinfo.com/components-of-polymerase-chain-reaction/> - The Science Info. *Components of polymerase chain reaction* [consulté le 13/06/2019]. Disponible.

<http://www.fao.org/faostat/fr/#data/OC/visualize> - Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). *Quantités de production de Melons, cantaloups par pays* [consulté le 13/06/2019]. Disponible.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techdcaps/> - NCBI. *Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (dCAPS)* [consulté le 13/06/2019]. Disponible.

<http://ips2.u-psud.fr/fr/plateformes/epitrans-epigenomique-biologie-translationnelle.html> - IPS2. *EPITrans : Épigénomique, Biologie Translationnelle* [consulté le 13/06/2019]. Disponible.

<http://ips2.u-psud.fr/fr/plateformes/spomics-interatome-metabolome-transcriptome.html> - IPS2. *SPOmics : InterATOME, Métabolome, Transcriptome* [consulté le 13/06/2019]. Disponible.

Glossaire et abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

Hz : Hertz

PCR : Polymerase chain reaction

IPS2 : Institut des Sciences des Plantes de Paris-Saclay

INRA : Institut national de la recherche agronomique

CNRS : Centre national de la recherche scientifique

DGG : département génomique et génétique du développement

DPHYS : département physiologie et signalisation

PMIN : département interactions plantes microorganismes et réseaux

CTAB : Cetyl triméthylammonium bromide

Buffer : Tampon de solution

EPITRANS - ÉPIGÉNOMIQUE, BIOLOGIE TRANSLATIONNELLE : “ plateforme EPITRANS est de développer des outils de génomique et d'épi-génomique afin d'explorer la diversité allélique et épi-allélique chez les plantes modèles et cultivées et d'en créer une nouvelle.” (source IPS2)

SPOMICS - INTERATOME, MÉTABOLOME, TRANSCRIPTOME : “Son objectif est de générer et d'intégrer des données moléculaires à haut débit pour des projets multi-échelles sur des espèces végétales modèles et non modèles.”

FLOCAD : Flower and Carpel Development

Vrille : Organe de fixation de certaines plantes grimpantes, qui s'enroule en hélice

EMS : méthanesulfonate d'éthyle, substance mutagène.

Tilling : Targeting Induced Local Lesions in Genomes, méthode utilisant des mutagenèse aléatoire

TAQ (polymerase) : enzyme (thermo-sensible) utilisé en PCR afin de répliquer et amplifier l'ADN

dNTP : mélange de désoxyribonucléotides utilisé dans une PCR

BSA : bovine serum albumin

pb : paire de base

V : Volt
 CLF : Curly Leaf
 SWN : Swninger
 MEA : Medea

Annexes

Organigramme complet de l'IPS2

