Caractérisation fonctionnelle de JMJ24, une déméthylase d'histone de la famille JUMONJI, chez Arabidopsis thaliana

Laure Audonnet

▶ **To cite this version:**

Laure Audonnet. Caractérisation fonctionnelle de JMJ24, une déméthylase d'histone de la famille JUMONJI, chez Arabidopsis thaliana. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA112033 . tel-00998046

HAL Id: tel-00998046

https://theses.hal.science/tel-00998046

Submitted on 30 May 2014

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.

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : SCIENCES DU VÉGÉTAL
Institut de Biologie des Plantes

DISCIPLINE : BIOLOGIE

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue le 26/02/2014

par

Laure AUDONNET

Caractérisation fonctionnelle de JMJ24, une déméthylase d'histone de la famille JUMONJI, chez Arabidopsis thaliana

Composition du jury :

Directeur de thèse :	Dao-Xiu ZHOU	PR Université Paris Sud (IBP, Orsay)
Directrice de thèse :	Natalia CONDE E SILVA	MCF Université Paris Sud (IBP, Orsay)
Rapporteurs :	Thierry LAGRANGE	DR2 CNRS (LGDP, Perpignan)
	Pierre CAROL	PR UPMC (Campus JUSSIEU, Paris)
Examinateurs :	Frédy BARNECHE	CR1 CNRS (IBENS, Paris)
	Valérie GEFFROY	DR2 INRA (IBP, Orsay)

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'aimerais remercier l'équipe de direction de m'avoir accueillie au sein de l'Institut de Biologie des Plantes.

Je tiens également à remercier Madame Valérie Geffroy et Messieurs Thierry Lagrange, Pierre Carol et Frédy Barnèche d'avoir acceptés de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie aussi mon directeur de thèse Dao-Xiu Zhou pour son accueil, sa confiance, l'autonomie et la liberté avec laquelle il m'a permise de travailler.

Merci à Natalia, ma co-directrice de thèse. OUI, TROIS ANS C'EST COURT! Merci de les avoir passés à mon écoute, de m'avoir appris la rigueur, de m'avoir fait partager ta passion de la science, même si je resterais surement hermétique à la biochimie pour quelques années encore. Merci aussi d'avoir cru en moi et de m'avoir toujours soutenue.

Merci à Yves aka Papa Ours pour ton inexorable patience, ton écoute, ta bonne humeur et la facilité avec laquelle tu te laissais entrainer dans mes délires... Promis je vais tenter d'arrêter de saper ta crédibilité à l'avenir (ou pas). Merci aussi d'avoir toujours été présent pour me soutenir et m'encourager.

Merci à Yuan, ma « compagne de galère », Yongfeng et Caroline, pour l'aide qu'ils m'ont apportée à mon arrivée et par la suite, ainsi que pour les échanges très enrichissants aussi bien professionnels que personnels que nous avons ensuite eu tout au long des ces années. Bon courage pour la suite à tous les trois !

Merci aussi à Laure, un soutien sans faille dans les moments de doute et une très belle amitié. Merci d'avoir partagé mes joies et mes peines. Je te souhaite un avenir radieux !

Merci à Mathilde, deuxième très belle surprise amicale de cette thèse ! Merci d'avoir eu le swag et de m'avoir saucée lors de ton, à mon sens, trop court passage dans l'équipe. C'était so énorme ! Je suis sure que tout va bien aller pour toi maintenant, gardes le cap !

Merci à Martin « papi WOX » Kreis pour sa gentillesse et pour les moments partagés à la cafétéria.

Merci à Manon, Edouard, Youyou et Jean-Chaude pour les bons moments partagés autour d'une camomille ou d'une table de ping-pong.

Merci à Gilles pour avoir pris soin de mes plantes et les petites commandes spéciales honorées passées sur le tableau de la serre.

Merci à Jean-Paul et Eric, ainsi que Sophie Massot, sans qui la « boutique » ne tournerait pas aussi bien.

REMERCIEMENTS

Merci aussi à Myriam et Mama à la laverie de faciliter notre quotidien et pour l'accueil très chaleureux qu'elles m'ont réservé.

Merci également à toutes les personnes de l'institut qui m'ont témoigné de la sympathie tout au long de ces trois années.

Un énorme merci à mes parents, mon grand père et ma grand-mère (j'aurais tellement voulu que tu sois encore là pour me voir) pour tout leur amour, leur soutien sans pareil et leur foi en moi. Merci à mon frère Loïc et sa femme pour m'avoir laissée squatter leur appartement pendant la rédaction de ce manuscrit. Merci également à mes amis, Alexandre, Maxime, Patrick, Sylvain, et j'en passe, pour leurs encouragements et la patience dont ils ont fait et font toujours preuve à mon égard. Merci aussi à Mathieu pour m'avoir accompagné quelques années et sans qui je ne me serais peut-être pas lancée dans une telle aventure. Et enfin spéciale dédicace à mon deuxième frère, Stephan, et Julien Chassain.

ABBRÉVIATIONS

ADN/DNA	Acide désoxyribonucléique
AG	Agamous
AGO	Argonaute
ARN/RNA	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
ARN pol	ARN polymérase
ATX	TRITHORAX-LIKE PROTEIN
CAC1	CACTA 1 ELEMENT
CATMA	Complete Arabidopsis Transcriptome Microarray
ChIP	Immunoprécipitation de la chromatine
CK	Cytokinine
CKX	CytoKinine oXidase/déhydrogénases
CLF	CURLY LEAF
CMT3	CHROMOMETHYLASE 3
DAPI	4',6-DIAMIDINO-2-PHENYLINDOLE
DCL	DICER LIKE
DDM1	DECREASE IN DNA METHYLATION
DRM1 et 2	DOMAIN REARRANGED METHYLASE 1 et 2
E(z)	Enhancer of zeste
EVD	EVADE
FLC	FLOWERING LOCUS C
FT	FLOWERING LOCUS T
FTs	Facteurs de Transcription
FTG	Facteurs de Transcription Généraux
FWA	FLOWERING WAGENINGEN
GCN4	GENERAL CONTROL NON-REPRESSIBLE 4
GCN5	GENERAL CONTROL NON-REPRESSIBLE 5
GFP	GREEN FLUORESCENT PROTEIN
GUS	β-GLUCORONIDASE
H2A	HISTONE H2A
H2B	HISTONE H2B
H3	HISTONE H3
H4	HISTONE H4
HDM	Histone DeMethylase
HMT	Histone MethylTransferase
IBM1	INCREASE IN BONSAI METHYLATION 1
INTACT	Isolation of Nuclei TAgged in specific Cell Type
JMJ	JUMONJI-C DOMAIN CONTAINING PROTEIN
JHDM	Jumonji Histone DeMethylase

ABBRÉVIATIONS

KDM	Lysine (K) Demethylase
KMT	Lysine (K) Methyltransferase
KYP	KRYPTONITE
LHP1	LIKE HETEROCHROMATINE PROTEIN 1
LFY	LEAFY
LSD1	LYSINE SPECIFIQUE DEMETHYLASE 1
MBD	methyl-CG binding domain
MEA	MEDEA
MET1	METHYLTRANSFERASE 1
NLS	Nuclear Localization Signal
O/N	Over Night
PcG	Polycomb Group
PCR	Polymerase Chain Reaction
PHD	PLANT HOMEODOMAIN
PIC	PreInitiation Complex
PRC1 et 2	POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX 1 et 2
PRMT	Arginine MethylTransferase
PTGS	Post-Transcriptionnal Gene Silencing
PTM	Post-Translationnal Modification
qPCR	PCR quantitative
RdDM	RNA dependant DNA METHYLATION
RDR	RNA DEPENDANT RNA POLYMERASE
REF6	RELATIVE OF EARLY FLOWERING 6
RING	REALLY INTERESTING NEW GENE
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RT-PCR	Reverse-Transcription PCR
SAM	S-Adenosyl-L-Methionine
siRNA	small interfering RNA
sRNA	small RNA
SSLP	Simple Sequence Length Polymorphism
Su(z)	Supressor of zeste
SUVH	SUPRESSOR OF VARIAGATION HOMOLOG
SWI/SNF2	SWItch/Sucrose NonFermentable 2
SWN	SWINGER
TE	Transposable Element
TGS	Transcriptionnal Gene Silencing
TSS	Transcritpion Start Site

SOMMAIRE

INTRODUCTION GÉNÉRALE *1*

I. STRUCTURE DE LA CHROMATINE **1**

A. Le nucléosome, unité de base 1

1. Les composants du nucléosome 1

2. La formation du nucléosome 3

B. De l'ADN au chromosome 4

C. Euchromatine vs. hétérochromatine 5

1. Définitions 5

2. Transition entre hétéro- et euchromatine 7

II. DYNAMIQUE DU NUCLÉOSOME **7**

A. Les facteurs de remodelage 8

B. Les variants d'histones 10

C. Méthylation de l'ADN 10

1. Mécanismes 10

2. Relation entre petits ARN et méthylation de l'ADN 13

D. Les modifications post-traductionnelles des histones 18

III. DYNAMIQUE DES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES HISTONES **19**

A. L'acétylation 19

1. Les histones acétyltransférases 20

2. Les histones déacétylases 20

B. La phosphorylation et l'ubiquitination 21

C. La méthylation 21

1. Méthylation des arginines 22

2. Méthylation des lysines 24

D. Relation entre les différentes modifications post-traductionnelles 25

IV. RÔLE ET DYNAMIQUE DE LA MÉTHYLATION DES HISTONES **26**

A. Fonctions 26

1. Dualité de la méthylation H3K27 : entre formation de l'hétérochromatine et développement 26

2. Méthylation H3K4 et protéines Trithorax 27

3. Méthylation H3K36 et protéines de la famille ASH1 28

4. Méthylation des histones H3K9 et méthylation ADN : des processus liés 29

B. Déméthylation des lysines 31

1. La famille LSD1 31

2. La famille JUMONJI 32

V. DYNAMIQUE DE LA CHROMATINE : L'EXEMPLE DE FLC **44**

VI. OBJECTIFS DE LA THESE **45**

RÉSULTATS ET DISCUSSION *46*

I. QUELLE EST LA FONCTION BIOLOGIQUE DE JMJ24 ? **46**

A. Caractérisation des mutants jmj24 46

1. Présentation des allèles 46

2. Etude phénotypique des mutants *jmj24* 50

3. Analyses de la complémentation fonctionnelle des mutants *jmj24* 57

B. Étude des lignées d'introgressions jmj24-1C et jmj24-2W 58

C. Expression tissulaire de JMJ24 59

D. Dérégulation de l'expression des gènes dans le mutant jmj24-2 64

SOMMAIRE

E. Discussion 66

II. JMJ24 EST-ELLE IMPLIQUÉE DANS LA MÉTHYLATION DES HISTONES? 69

A. Interaction génétique entre JMJ24 et les gènes du cluster à domaine JmjC seul 69

B. Interaction génétique entre JMJ24 et les gènes JMJ membres du cluster spécifique des plantes 70

1. Étude des double mutants *jmj24jmj15*, *jmj24jmj18* et *jmj24jmj19* 72

2. Étude des double mutants *jmj24jmj14* 72

C. Interaction génétique entre JMJ24 et les gènes JMJ du cluster KDM3 73

1. Étude du double mutant *jmj24jmj28* 73

2. Étude du double mutant *jmj24ibm1* 73

D. Effet de la surexpression de JMJ24 84

E. Discussion 85

III. UN RÔLE POUR JMJ24 DANS LES AUTRES VOIES DE RÉPRESSION? 89

A. JMJ24 affecte-t-elle la méthylation ADN ? 89

B. JMJ24 est-elle impliquée dans l'interférence par l'ARN ? 93

1. Présentation des voies 93

2. Analyse des croisements avec des mutants *dcl2;3;4* 94

C. Discussion 97

DISCUSSION GÉNÉRALE 101

MATÉRIEL ET MÉTHODES 104

I. MATÉRIEL 104

A. Matériel végétal 104

1. Lignées 104

2. Conditions de culture 105

B. Matériel bactérien 106

II. MÉTHODES 106

Clonages 106

1. Construction des lignées proJMJ24:GUS et proJMJ24:intron1:GUS 106

2. Construction de la lignée *pro35S:JMJ24* 107

3. Construction de la lignée proJMJ24:ADNcJMJ24 107

4. Transformation des bactéries 108

5. Transformation d'Arabidopsis 108

B. Génotypage par PCR des lignées d'insertion ADN-T 108

1. Extraction des ADNg 108

2. PCR 109

C. Phénotypage 109

1. Mesure de la longueur racinaire 109

2. Mesure de la surface des cotylédons 109

3. Nombre d'organes floraux 109

4. Cytométrie en flux 110

5. Microscopie électronique à balayage 110

D. Analyses de l'expression génique 110

1. Extraction des ARNs 110

2. RT-PCR 110

3. RT-PCR quantitative (RT-PCRq) 111

4. Analyse du transcriptome d'Arabidopsis 111

5. Localisation tissulaire de l'expression du gène *JMJ24* par coloration GUS 112

SOMMAIRE

E. Analyse de la méthylation de l'ADN 112
1. Digestion par HpaII/MspI 112
2. Séquençage après conversion au bisulfite 113
F. Analyse des modifications d'histone 115
1. Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) 115

III. ANALYSES *IN SILICO* **119**

BIBLIOGRAPHIE ***120***

ANNEXES ***141***

INTRODUCTION GÉNÉRALE

De par leur absence de mobilité, les plantes sont contraintes à faire face aux agressions et aux autres variations de l'environnement à l'aide de réponses physiologiques et de modes de développement adaptés. Certains de ces modes de fonctionnement reposent sur des modifications épigénétiques, à savoir des changements héréditaires dans la fonction des gènes, ayant lieu sans altération de la séquence ADN. Ces changements sont basés sur des modifications de la chromatine, des modifications de l'ADN ou la dégradation de l'ARN.

I. STRUCTURE DE LA CHROMATINE

A. Le nucléosome, unité de base

Chez les eucaryotes, la chromatine est constituée par l'étroite association de la double hélice d'ADN avec les histones et d'autres protéines structurelles et fonctionnelles, et dont le nucléosome est l'unité élémentaire et répétitive. Chaque nucléosome consiste en l'enroulement d'environ 146 pb d'ADN autour d'un cœur d'histones (Olins and Olins, 2003). Une région variable d'ADN de liaison (« linker »), entre 20 et 80 pb (la longueur de la séquence varie entre les différents eucaryotes), sépare deux nucléosomes adjacents.

1. Les composants du nucléosome

1.1 L'ADN

L'Acide DésoxyriboNucléique, ou ADN, est un polymère de nucléotides (**figure 1.1a**) composés d'un groupement phosphate, d'un sucre (un désoxyribose) et d'une base azotée. La succession de ces nucléotides se fait par une liaison phosphodiester et forme un brin dont l'orientation est définie de l'extrémité 5' (pour l'extrémité phosphate libre) vers 3' (pour l'extrémité hydroxyle du sucre) (**figure 1.1b**). Deux brins orientés antiparallèlement s'enroulent l'un autour de l'autre pour former une double hélice droite par appariement des bases deux à deux (**figure 1.1c**).

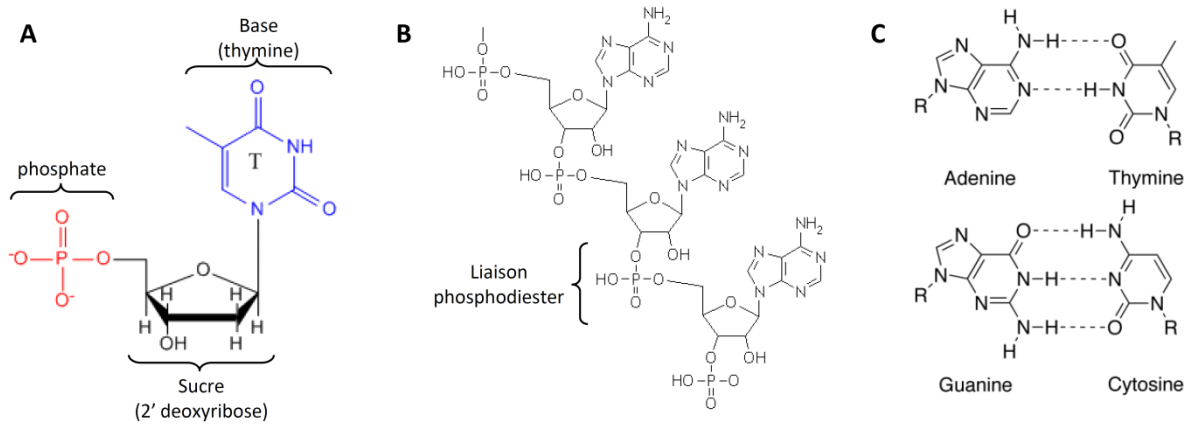


Figure 1.1 : ***L'acide désoxyribonucléique***. (**A**) Un nucléotide. (**B**) Un brin d'ADN montrant les liaisons phosphodiesters. (**C**) L'appariement des bases. L'adénine s'apparie avec la thymine et la guanine avec la cytosine.

1.2 Les histones

Dans l'historique des découvertes de la chromatine décrit par Olins et Olins (Olins and Olins, 2003), nous apprenons que les histones sont décrites pour la première fois en 1884 par Albrecht Kossel, et ont tout d'abord été considérées comme étant le support de l'information génétique, avant que ne soit mise en évidence l'existence de quatre types d'histone dite canonique : H2A, H2B, H3 et H4 par Roger Kornberg. Ces histones sont constituées d'un domaine de « repliement des histones » et de deux queues N- et C-terminales (Arents *et al.*, 1991) (**figure 1.2**). De plus, il existe un cinquième type d'histone, l'histone de liaison H1, qui est retrouvée au niveau des séquences internucléosomiques, mais qui présente une structure différente des histones de cœur.

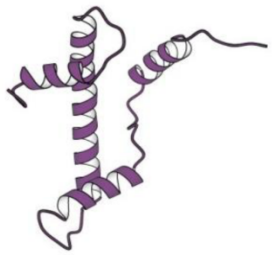


Figure 1.2 : ***Repliement des histones***. Les histones de coeur (H2A, H2B, H3 et H4) adoptent toutes la même structure secondaire appelée "*histone fold*", qui consiste en un enchaînement de trois hélices α.

2. La formation du nucléosome

La première étape de la formation du nucléosome est l'enroulement de ~55pb d'ADN autour d'un tétramère $(H3\text{-}H4)_2$ pour former le tétrasome. Puis deux dimères H2A-H2B viennent prendre le tétrasome en sandwich en enroulant 45 pb supplémentaires chacun. 1,65 tour d'ADN s'enroule ainsi autour de l'octamère (**figure 1.3**). L'ADN en interaction avec les histones est protégé contre l'action de différentes nucléases, contrairement à l'ADN de liaison, reliant deux nucléosomes successifs. Les parties amino-terminales des histones H2B, H3 et H4, ainsi que la partie carboxy-terminale de l'histone H2A, forment des extensions flexibles en dehors du corps compact du nucléosome. Riches en lysines et arginines, et donc fortement chargées positivement, elles seraient à l'origine de contacts inter- et intra-nucléosomiques (Luger *et al.*, 1997). En effet, avec entre autres 14 points de contact privilégiés entre les histones et l'ADN, cela en fait l'un des complexes protéines-ADN les plus stables en conditions physiologiques (Luger *et al.*, 1997).

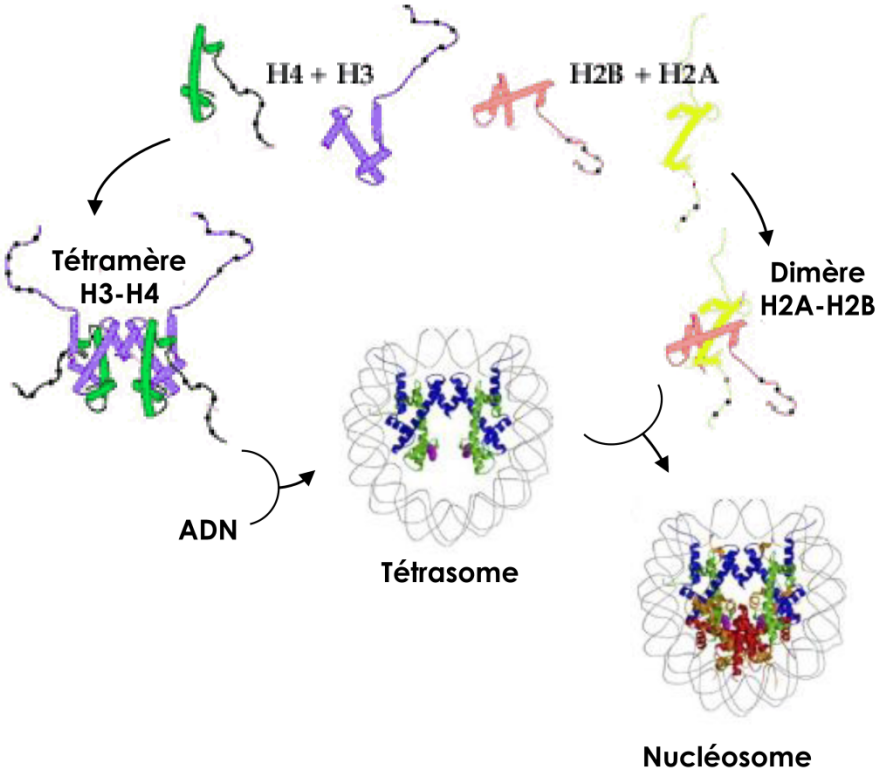


Figure 1.3 : ***Formation du nucléosome***. Le tétrasome est formé par l'enroulement de l'ADN autour d'un tétramère d'histones H3-H4. Puis ce tétrasome est pris en sandwich par deux dimères H2A-H2B, pour former le nucléosome.

B. De l'ADN au chromosome

Chaque cellule eucaryote possède environ deux mètres d'ADN pour un noyau de seulement quelques micromètres de diamètre. L'ADN va alors être compacté jusqu'à former les chromosomes, tout en devant rester accessible à l'ensemble de la machinerie nucléaire.

La première étape de compaction est donc la formation des nucléosomes, qui vont ensuite s'organiser en différentes structures hiérarchiques. Le diamètre de cette fibre de nucléosomes mesure alors 11 nm et possède l'aspect d'un « collier de perle ». Le niveau suivant correspond à la fibre de 30 nm de diamètre et présente un niveau de compaction de 70 à 160 kb.µm^{-1} (Fransz and de Jong, 2011). Deux modèles ont été proposés pour la formation de cette fibre : (1) le modèle du solénoïde, ou modèle à « un seul départ », dans lequel le nucléofilament s'enroule en hélice, avec l'ADN de liaison courbé entre les différents nucléosomes ; et (2) le modèle en zigzag, ou modèle à « deux départs », dans lequel les ADN de liaison se croisent à l'intérieur de la structure (**figure 1.4**). Il a même été suggéré dernièrement que les deux modèles pourrait coexister sur une même fibre (Bian and Belmont, 2012). Les histones de liaison H1 vont permettre la stabilisation de cette fibre.

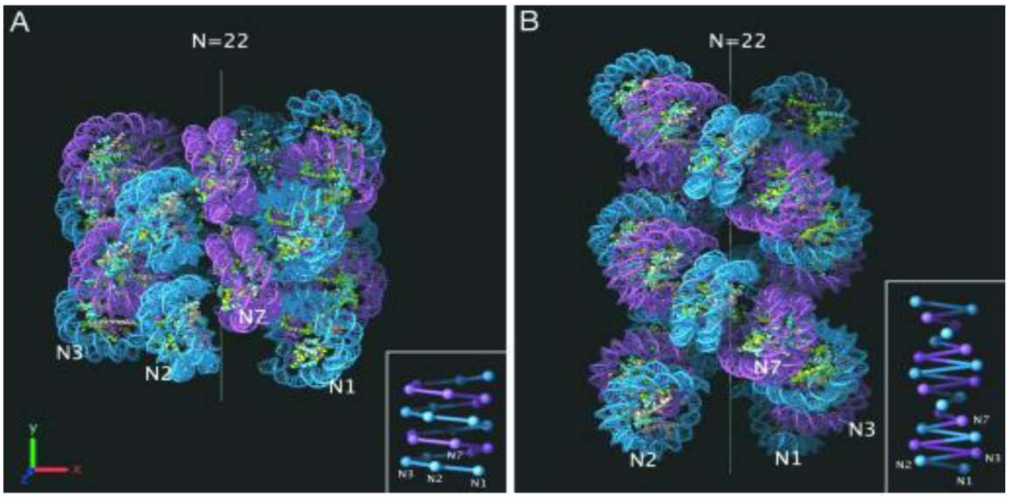


Figure 1.4 : ***Les différents modèles de fibre de 30 nm***. (**A**) le modèle du solénoïde. (**B**) Le modèle en zigzag. Robinson et al., 2006.

Un niveau d'organisation supplémentaire de l'ADN dans les noyaux peut être défini par l'attachement de la chromatine aux composants de la matrice cellulaire (correspondant à une compaction d'environ 1 Mb.µm^{-1}). Le maximum de compaction est atteint pendant la métaphase de la mitose (16 Mb.µm^{-1}) (Fransz and de Jong, 2011).

C. Euchromatine vs. hétérochromatine

1. Définitions

L'observation cytogénétique du noyau cellulaire révèle une organisation simple du contenu nucléaire. Le volume nucléaire est en effet occupé par deux formes distinctes de chromatine : l'euchromatine, peu condensée, et l'hétérochromatine, fortement condensée. Les régions hétérochromatiniennes sont majoritairement contenues dans des structures facilement identifiables, notamment par coloration des noyaux au DAPI, appelées chromocentres (Fransz *et al.*, 2002). La présence de chromocentres n'est pas systématique, les noyaux des cellules humaines par exemple n'en possèdent pas, tandis que chez la souris, les noyaux comportent entre vingt et quatre-vingt chromocentres (Guenatri *et al.*, 2004). Chez *Arabidopsis thaliana*, les chromocentres se situent principalement à la périphérie du noyau et autour du nucléole. Ce dernier sous-compartiment du noyau est peu coloré par le DAPI et est le siège de la transcription des ARN ribosomiques. Les noyaux interphasiques d'*Arabidopsis* présentent généralement entre 6 et 10 chromocentres (Fransz *et al.*, 2002). Quant aux régions euchromatiniennes, elles s'organiseraient « en rosette » autour de ces chromocentres, en boucles de 0,2-2 Mpb (**figure 1.5**). Ce modèle d'organisation, appelé également modèle « chromocenter-loop » (chromocentre-boucle) suppose l'existence de séquences « d'ancrage » situées dans les boucles euchromatiniennes, fixant la fibre à un

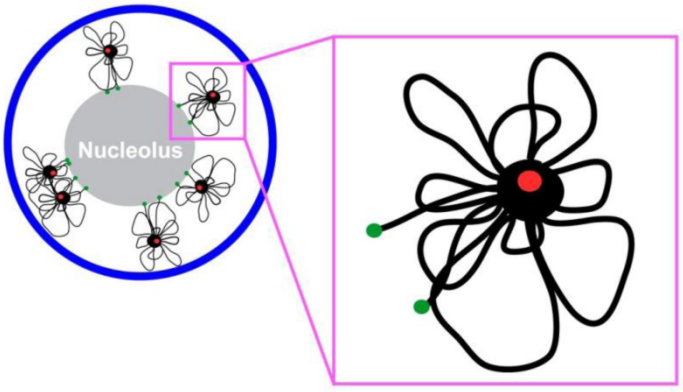


Figure 1.5 : ***Organisation des chromosomes interphasiques***. L'organisation « en rosette » des chromosomes observée chez *Arabidopsis*. Les six chromosomes (noir) avec leur chromocentre (point noir) sont représentés. Rouge = centromères. Vert = télomères. Adapté de Pawlowski, 2010.

chromocentre (Pawlowski, 2010). L'identité de ces points d'ancrage n'a toutefois pas encore été élucidée. L'organisation en rosette n'est pas figée, la taille et la compaction des chromocentres étant soumises à régulation. Chez *Arabidopsis*, des chromocentres présentant une taille réduite ont pu être décrits dans différentes situations et notamment pour les mutants *ddm1* et *met1* (Soppe *et al.*, 2002). Des analyses de FISH ont montrées que la réduction de la taille des chromocentres était due à la décompaction et à la dispersion des régions péricentromériques (Soppe *et al.*, 2002).

L'analyse du positionnement des nucléosomes le long de la fibre d'ADN chez la levure a permis également de différencier l'hétérochromatine de l'euchromatine. En effet, dans un contexte hétérochromatinien, les nucléosomes sont disposés de manière régulière, tandis que dans les régions euchromatiniennes, leur agencement est beaucoup plus irrégulier (Yuan *et al.*, 2005). L'euchromatine se trouve alors dans un état dit relâché, et l'hétérochromatine dans un état dit compacté.

La composition génique varie également entre ces deux structures, avec l'hétérochromatine principalement composée de séquences d'ADN répétées et d'éléments transposables, et l'euchromatine de séquences riches en gènes (Huisinga *et al.*, 2006). De ce fait, l'hétérochromatine est généralement transcriptionnellement inactive et porte des marques biochimiques associées à la répression transcriptionnelle. La transcription de certaines séquences demeure cependant possible (Grewal and Elgin, 2007; Smith *et al.*, 2007a), bien que les niveaux de transcription ne s'apparentent pas à ceux des gènes présents dans les régions euchromatiniennes, portant majoritairement des marques associées à l'activation transcriptionnelle. De plus, les activités de recombinaison sont très réduites dans les régions hétérochromatiniennes durant la méiose (Karpen and Allshire, 1997).

L'hétérochromatine peut elle-même être subdivisée en deux types : hétérochromatine constitutive et hétérochromatine facultative :

- L'hétérochromatine constitutive correspondant à des régions importantes pour l'intégrité du génome, telles les centromères et les télomères, ainsi qu'aux séquences répétées et non-codantes, est maintenue dans un état de condensation stable (Grewal and Jia, 2007).

- L'hétérochromatine facultative est, elle aussi, transcriptionnellement réprimée, mais possède le potentiel pour être convertie en euchromatine. Elle peut, par ailleurs, adopter une large gamme d'état de condensation, qui peut aller de la fibre de 11 nm à des structures chromatiniennes supérieures (Trojer and Reinberg, 2007).

2. Transition entre hétéro- et euchromatine

La conversion de l'hétérochromatine facultative en euchromatine illustre parfaitement le concept de dynamique chromatinienne. Cependant cette décondensation n'est rendue possible que dans certains contextes : (1) temporel (par exemple, certains stades développementaux ou certains stades spécifiques du cycle cellulaire), (2) spatiaux (par exemple, des changements de localisation nucléaire de la périphérie au centre, ou vice versa, suite à des signaux ou facteurs exogènes) ou (3) parentaux/héritables (par exemple, expression de gène monoallèlique) (Trojer and Reinberg, 2007).

De plus, si la conversion de l'hétérochromatine facultative en euchromatine est observable, l'inverse l'est aussi. En effet, lors de sa mise en place, l'hétérochromatine facultative peut s'étendre aux régions adjacentes. C'est pourquoi des mécanismes ont été mis en place afin de stopper cette expansion au niveau de régions actives. Si certains promoteurs forts peuvent se prémunir de la formation d'hétérochromatine facultative (Raab *et al.*, 2012), la plupart du temps ce sont des éléments ADN spécialisés, appelés « chromatin barrier » (éléments barrières) ou « insulators », qui vont être nécessaires à la démarcation de la frontière de l'hétérochromatine facultative (Gaszner and Felsenfeld, 2006).

La mesure de l'accessibilité de l'ADN à la DNaseI a montré que la transition entre l'hétérochromatine, moins accessible à cette endonucléase, et l'euchromatine, accessible, se fait de manière graduelle et non de manière brutale. De même, les séquences péricentromériques, bien qu'hautement enrichies en régions chromatiniennes inaccessibles, ne forment pas des blocs uniformes, mais sont interrompues par des portions plus accessibles. Ces interruptions sont plus fréquentes à mesure que la distance au centromère augmente (Shu *et al.*, 2012).

II. DYNAMIQUE DU NUCLÉOSOME

Le nucléosome n'est pas une simple unité statique, mais une structure dynamique qui va pouvoir être remodelée par des mécanismes distincts, comprenant l'action de facteurs de remodelage, le remplacement des histones canoniques par des variants, des modifications de l'ADN et des queues des histones.

A. Les facteurs de remodelage

Tous les facteurs de remodelage partagent cinq propriétés de base : (1) une affinité pour le nucléosome, au-delà de l'ADN lui-même ; (2) la présence de domaines qui reconnaissent les modifications covalentes des histones ; (3) la présence d'une sous-unité ATPase dépendante de l'ATP, requise pour le remodelage et servant de moteur à la translocation de l'ADN afin de casser les contacts entre ADN et histones ; (4) la présence de domaines et/ou protéines qui régulent l'activité de l'ATPase ; et (5) la présence de domaines et/ou protéines permettant l'interaction avec d'autres facteurs de la chromatine ou de transcription (Clapier and Cairns, 2009).

Les facteurs de remodelage interviennent dans la plupart des grands processus cellulaires, pendant lesquels ils vont être nécessaires au déplacement, à l'éviction ou à la restructuration des nucléosomes (**figure 1.6**). Chez *Arabidopsis*, il a été montré une diminution de la fréquence d'évènements de recombinaison homologue dans le mutant *atino80*, laissant supposer une implication de INO80 dans la réparation des cassures doubles brins (Fritsch *et al.*, 2004). Ces complexes, conservés aussi bien chez la levure, que chez l'humain et les plantes, sont composés de 2 à 15 sous-unités et sont regroupés en différentes familles en fonction de leur sous-unité ATPase (dont le domaine ATPase en lui-même, est composé de deux parties : DExx et HELICc) et de leurs sous-unités associées (Flaus *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2013). Actuellement, l'existence de quatre familles de complexes de remodelage de la chromatine est admise : (1) la famille SWI/SNF (SWItching defective/Sucrose NonFermenting), (2) la famille ISWI (Imitation SWItch), (3) la famille CHD (Chromodomain, Helicase, DNA binding) et (4) la famille INO80 (INOsitol requiring 80) (**figure 1.7**). Cependant certains complexes ATPase de type SWI/SNF prédits ne rentrent dans aucune de ces classes et attendent d'être caractérisés.

L'adressage de ces complexes de remodelage au niveau de leurs cibles se fait notamment par la reconnaissance de marques épigénétiques, telles les modifications post-traductionnelles des histones. Cette reconnaissance est rendue possible grâce à différents domaines : les bromodomaines (reconnaissance des lysines acétylées des histones), les chromodomaines (reconnaissance des lysines méthylées) et les domaines PHD (Plant HomeoDomain – lysines méthylées). Chez les plantes, des protéines de la famille CHD, et plus particulièrement la sous-famille CHD3, ont été identifiées comme impliquées dans la régulation des gènes. La protéine de riz CHR729, essentielle au développement de la plante, est capable de reconnaître *in vitro* les marques H3K27me3 et H3K4me3 *via* son domaine PHD et ses chromodomaines, respectivement. De plus, la

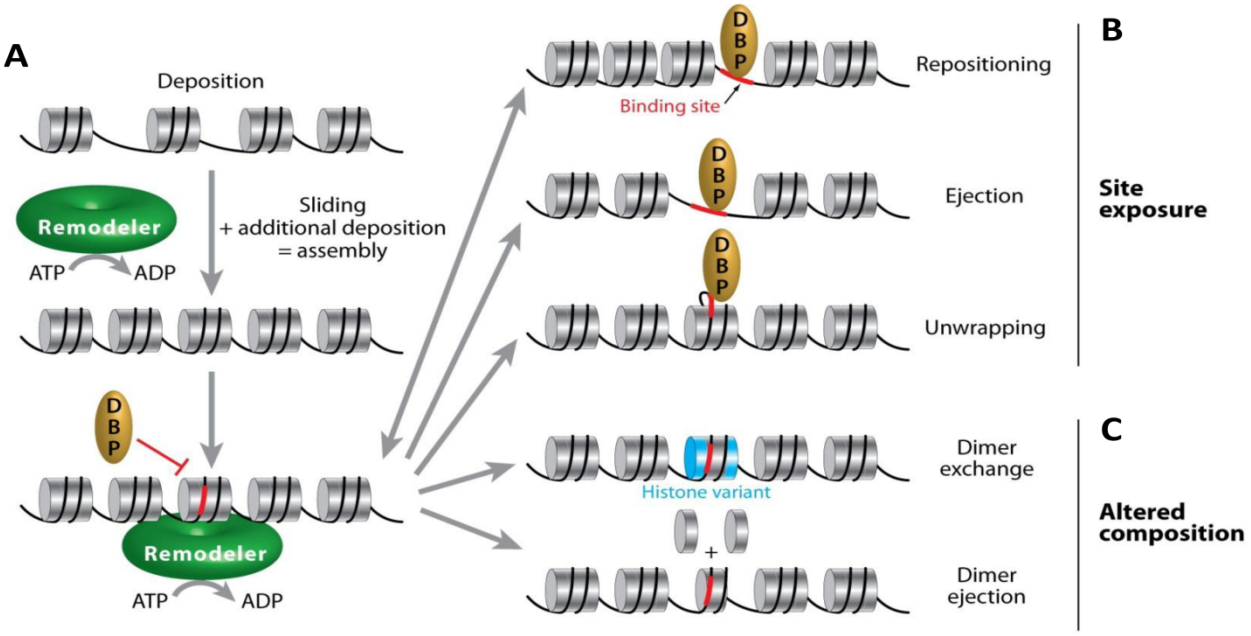


Figure 1.6 : ***Conséquence du remodelage de la chromatine***. (**A**) Les complexes de remodelage (vert) peuvent aider à l'assemblage de la chromatine en déplaçant des octamères d'histones déjà déposés, pour faire de la place pour le dépôt de nouvelles histones. L'action des complexes de remodelage peut avoir plusieurs résultats, classifiés en deux catégories : (**B**) exposition de séquence, pour laquelle une séquence (rouge) reconnue par une protéine de liaison à l'ADN (DBP) devient accessible par glissement de nucléosomes (« repositioning »), par éviction de nucléosomes (« ejection ») ou par désenroulement local (« unwrapping »), et (**C**) altération de la composition, pour laquelle le contenu du nucléosome est modifié par le remplacement d'un dimère [échange avec un dimère contenant des variants (bleu)] ou son éviction. Clapier and Cairns, 2009.

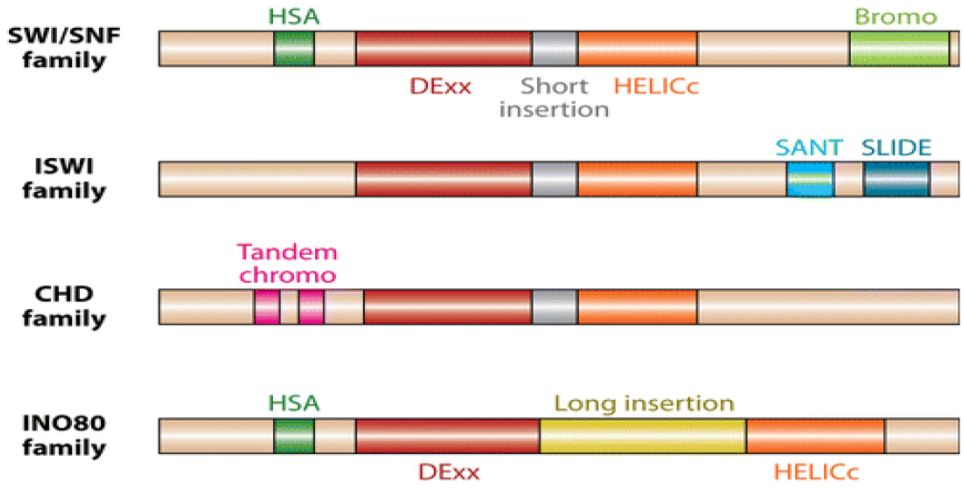


Figure 1.7 : ***Les différentes familles de complexes de remodelage de la chromatine chez l'Homme***. Toutes les familles possèdent une sous-unité ATPase de la famille SWI/SNF2, caractérisée par un domaine ATPase séparé en deux parties : DExx (rouge) et HELICc (orange). Chaque famille se distingue par les domaines uniques qui résident dans ou sont adjacent au domaine ATPase. Les complexes SWI/SNF, ISWI et CHD se caractérisent par une courte insertion (gris) à l'intérieur du domaine ATPase, tandis que la famille INO80 contient une longue insertion (jaune). Pour ce qui est des domaines adjacents, la famille SWI/SNF se distingue par un bromodomaine (vert clair) et un domaine HSA (hélicase-SANT, vert foncé), la famille ISWI par un module SANT-SLIDE (bleu), la famille CHD par des chromodomaines (rose) en tandem et la famille INO80 par un domaine HSA (vert foncé). Clapier and Cairns, 2009.

perte de CHR729 entraine une baisse des niveaux des ces deux marques sur ses gènes cibles, avec pour conséquence une variation de l'expression de ces gènes (Hu *et al.*, 2012). Chez *Arabidopsis*, PICKLE est impliquée dans la répression de gènes du développement par la promotion de la marque répressive H3K27me3 avec laquelle elle est retrouvée associée par Chromatin ImmunoPrécipitation (Zhang *et al.*, 2012), mais est aussi présente au niveau de *loci* ubiquitairement exprimés dont l'expression ne dépend pas d'elle, suggérant un rôle plus général au niveau de la structure chromatinienne *via* son activité de remodelage de la chromatine (Ho *et al.*, 2013).

B. Les variants d'histones

La chromatine peut être spécialisée par l'insertion de variants d'histones, au niveau des centromères, de gènes actifs ou de *loci* réprimés. Contrairement aux histones canoniques, ces variants sont généralement issus de gènes uniques dont la séquence diffère (Malik and Henikoff, 2003), et sont incorporés dans les nucléosomes indépendamment de la réplication. Les différences entre les variants et les histones canoniques peuvent se situer au niveau de la queue des histones, du domaine de repliement ou même dans une variation de quelques acides aminés clés.

A l'heure actuelle, aucun variant de l'histone H4 n'est connu et seuls quelques variants de l'histone H2B ont été identifiés, principalement spécialisés dans la chromatine du sperme et des testicules de certains organismes. Les variants d'histones concernent donc essentiellement les histones H2A et H3 (**Tableau 1.1**). Leurs fonctions peuvent être très spécifiques, comme CenH3 qui spécifie l'identité du centromère (Palmer *et al.*, 1987), ou plus larges, comme H2A.Z qui est impliqué dans de multiples processus de réponse aux *stimuli* extérieurs ainsi que dans la formation ou la résolution des crossing-over (Coleman-Derr and Zilberman, 2012; Choi *et al.*, 2013).

C. Méthylation de l'ADN

1. Mécanismes

La méthylation de l'ADN reste la modification épigénétique la mieux étudiée à ce jour et est très répandue chez les organismes eucaryotes. Sa propagation fidèle est nécessaire au développement correct de ces organismes, mais aussi à la répression des éléments transposables et des séquences répétées (Finnegan *et al.*, 1996; Miura *et al.*, 2001). Cette marque consiste en l'ajout d'un groupement méthyle sur les cytosines de

Tableau 1.1 ***Tableau des variants d'histones eucaryotes et leur fonction.*** Adapté de Ramaswany and Ioshikhes, 2013

Famille	Variant	Assemblé par (organisme)	Fonction
H1	Canonical	ISWI (*Drosophila*)	Compaction du génome
	$H1^0$		Répression de la transcription
	H5		Répression de la transcription
H2A	Canonical	FACT (levure, *Drosophila*, plantes)	Compaction du génome
	H2A.X	INO80 (levure)	Réparation des cassures double brin
	H2A.Z	SWR1 (levure), Tip60 (*Drosophila*), NAP-1 (human)	Insulation du promoteur, Thermosenseur
	MacroH2A		Inactivation du chromosome X
	MacroH2A1		Favorise les interactions entre les nucléosomes
	MacroH2A1.2		Inactivation des chromosomes sexuels méiotiques
	H2A.Bbd (Barr body deficient)	NAP-1 (human)	Activation de la transcription
H2B	Canonical	FACT (levure, *Drosophila*, plantes)	Compaction du génome
	TH2B		Spécifique des testicules
	H2BFWT		Spécifique des testicules
	H2BV		Initiation de la transcription
H3	Canonical	CAF1 (plantes, animals, champignons)	Compaction du génome
	H3.1	CAF1	Compaction du génome
	H3.2		Compaction du génome
	H3.3	HIRA (mammifères)	Compaction du génome/Remplacement
	H3.4		Compaction du génome
	CenH3		Identité du centromère
	H3t		Spécifique des testicules
	H3.X, H3.Y		Régulation des réponses cellulaires à des stimuli extérieurs
H4	Canonical	CAF1 (plantes, animals, champignons)	Compaction du génome

l'ADN en contexte CG, CHG et CHH (où H peut être un A, T ou C), à partir d'un donneur, la S-Adénosyl-L-Méthionine (SAM) (**figure 1.8a**).

Chez les mammifères, il est admis que la méthylation de l'ADN ne se produit quasi exclusivement que dans le contexte CG et que ces profils de méthylation CG sont maintenus au travers des divisions cellulaires par la méthyltransférase de maintien DNA metyltransferase 1 (Dnmt1). Dnmt1 reconnaît les sites CG hémiméthylés lors de la réplication (Goll and Bestor, 2005). Cependant une étude a révélé la présence importante de méthylation en contexte non-CG (CHG et CHH) dans la lignée de cellules souches embryonnaires humaines H1 (Lister *et al.*, 2009).

Chez *Arabidopsis*, les trois contextes sont représentés à hauteur de 24% pour la méthylation CG, 6,7% pour la méthylation CHG et 1,7% pour la méthylation CHH des cytosines totales (Cokus *et al.*, 2008). Le maintien de la méthylation va dépendre du contexte spécifique de la séquence (**figure 1.8b**):

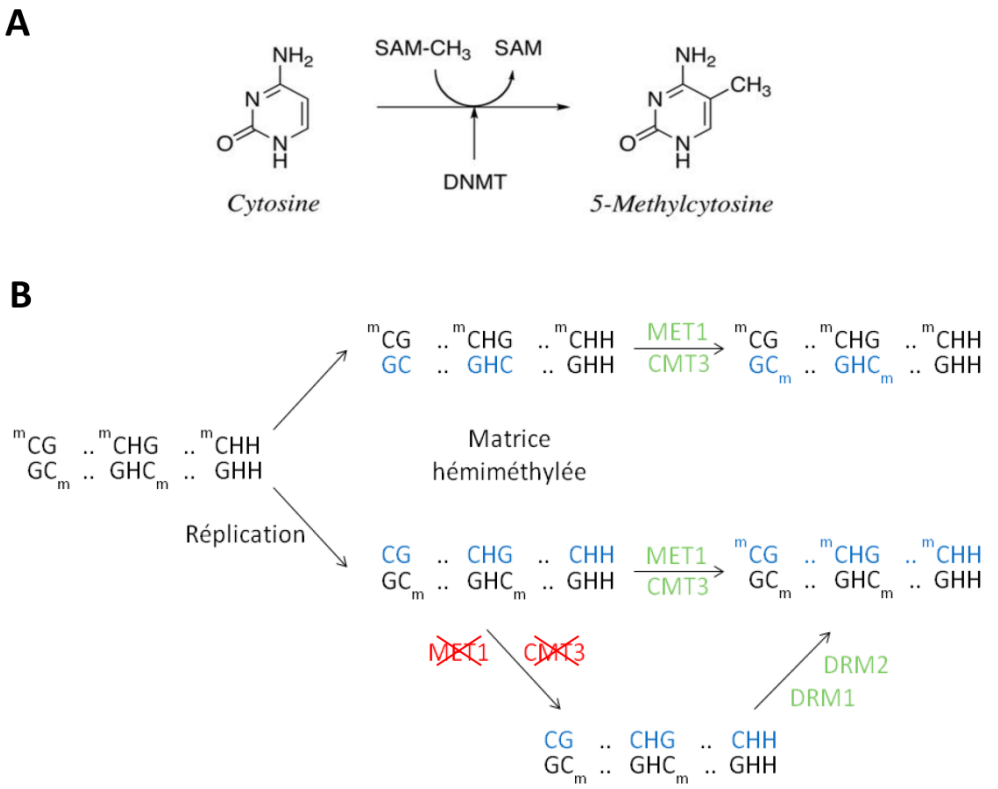


Figure 1.8 : ***Mécanisme de méthylation des cytosines***. (**A**) La méthylation des cytosines de l'ADN est catalysée par les ADN méthyltransférases. (**B**) Maintien de la méthylation ADN après réplication.

- La méthylation CG est maintenue par MET1 (Methyltransferase 1), homologue de Dnmt1 chez les mammifères, assistée de trois membres de la famille de cofacteurs VIM1-VIM3 (Variation In Methylation) (Law and Jacobsen, 2011).

- La méthylation non-CG est maintenue ou redéposée conjointement par les ADN méthyltransférases CMT3 (Chromomethylase 3) et CMT2, spécifiques des plantes, et DRM1 et DRM2 (Domains Rearranged Methyltransferase 1 et 2) (Cao and Jacobsen, 2002a; Stroud *et al.*, 2014).

2. Relation entre petits ARN et méthylation de l'ADN

Des analyses génétiques, moléculaires et biochimiques, ont révélé l'existence de voies de « RNA silencing » chez les plantes, les champignons et les animaux. Dans ces voies, un ARN double brin (dsRNA) est clivé en petit ARN (sRNA) double brin de 20- à 30-nt, par des endonucléases Dicer ou Dicer-like (DCL). Les sRNA sont alors chargés dans des protéines AGO au sein de complexes RISC, et les guident vers une séquence nucléotidique complémentaire. En fonction de la nature de l'ARN cible et de la protéine AGO impliquée, le RISC déclenche la méthylation de l'ADN ou la modification de la chromatine au niveau des cibles par la voie du RdDM (conduisant à une répression transcriptionnelle des gènes – TGS) ou au clivage de l'ARN ou l'inhibition de la traduction (conduisant à une répression post-transcriptionnelle des gènes – PTGS) (**figure 1.9 et 1.10**) (Parent *et al.*, 2012).

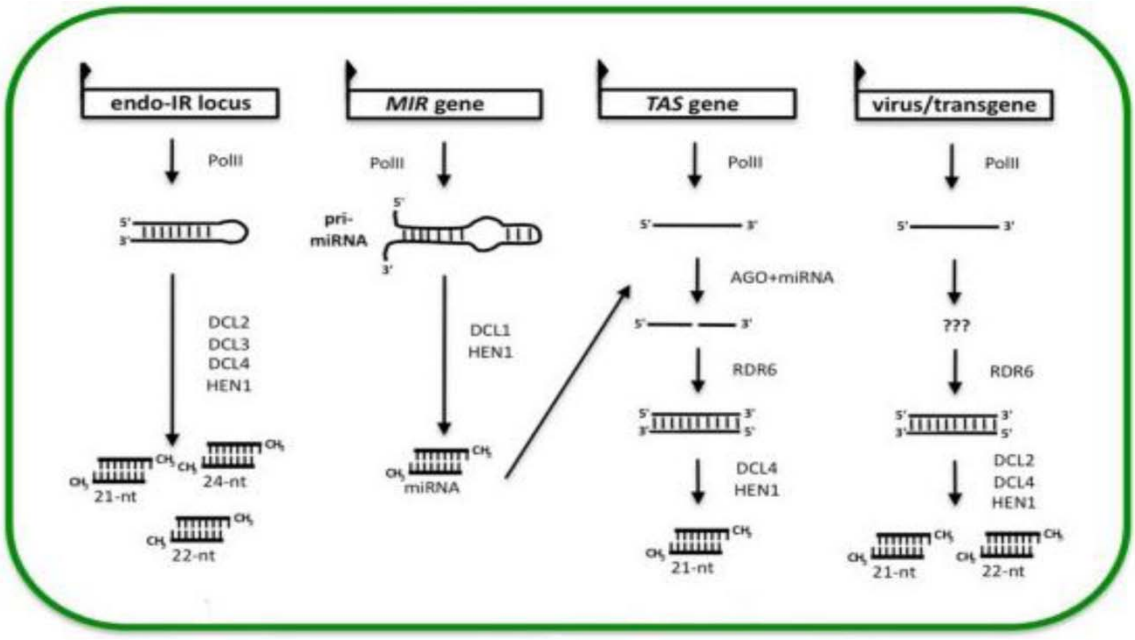


Figure 1.9 : ***Les différentes voies de synthèse des sRNA***. Ne sont représentées que les voies intervenant dans le PTGS. Adapté de Parent *et al.*, 2012.

2.1. La voie du RdDM

Bien que DRM2 agisse de manière redondante avec CMT3 pour le maintien de la méthylation CHG à certains *loci*, elle seule possède une activité de méthylation *de novo* de l'ADN (Cao and Jacobsen, 2002b). DRM2 est recrutée dans la voie du « RNA directed DNA Methylation » (RdDM) et peut méthyler les cytosines en contexte CG et non-CG (**figure 1.10**). La phase d'initiation du RdDM requiert le positionnement correct d'une ARN polymérase dépendante de l'ADN, spécifique des plantes, la Polymérase IV (Pol IV) au niveau de régions appropriées du génome (pour revue Haag and Pikaard, 2011). Le recrutement de la Pol IV au niveau de la majorité de ses sites cibles implique l'intervention de SHH1 (Sawadee Homeodomain Homolog 1), une protéine à homéodomaine qui reconnait la chromatine enrichie en H3K9me2 (Law *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013a), avec la protéine de remodelage de la chromatine CLSY1 (Classy 1) (Smith *et al.*, 2007b), suggérant que les modification post-traductionelles (MPT - **cf. §III**) des histones sont une importante caractéristique locale pour l'établissement du RdDM. À la fois SHH1 et CLSY1 s'associent avec la Pol IV, qui interagit physiquement avec RDR2 (RNA Dependent RNA polymerase 2) (Law *et al.*, 2011). RDR2 convertit l'ARN non-codant et simple brin (ssRNA), transcrit par la Pol IV, en dsRNA, qui est ensuite clivé en duplexes de sRNA de 24 nucléotides (nt) par la ribonucléase DCL3 (Dicer-like 3) (Xie *et al.*, 2004). Ces duplexes sont exportés du noyau vers le cytoplasme, où ils sont chargés dans une protéine effectrice Argonaute (AGO4, AGO6 ou AGO9), à l'état simple brin, pour former des complexes RISC (RNA-Induced Silencing Comlex) (Havecker *et al.*, 2010; Ye *et al.*, 2012), et procurent ainsi une spécificité de cible supplémentaire au RdDM. Le complexe RISC est alors réimporté dans le noyau, où il va scanner le génome à la recherche d'ARN naissants, transcrits par une autre ARN polymérase dépendante de l'ADN spécifique des plantes, la Pol V, et complémentaire au sRNA chargé. AGO4, par exemple, interagit avec les membres du complexe DDR, comprenant RDM1, DMS3 et DRD1, qui aide à la transcription de l'ARN par la Pol V (Wierzbicki *et al.*, 2009; Law *et al.*, 2010). L'association du sRNA chargé dans AGO4 avec l'ARN transcrit par la Pol V, principalement au niveau de transposons positionnés dans le promoteur de gènes codants, stimule le recrutement de DRM2 afin de catalyser la méthylation *de novo* de l'ADN du *locus* cible (Law and Jacobsen, 2011; Zheng *et al.*, 2013). Récemment, il a été montré que l'implication de la machinerie d'épissage permettrait de favoriser cette voie (Zhang *et al.*, 2013a; Dou *et al.*, 2013). Des variantes de cette voie existent avec des sRNA initiateurs indépendants de la Pol IV (Pontes *et al.*, 2009; Douet *et al.*, 2009) ou de RDR2 (Pontier *et al.*, 2012), et des sRNA de 21 nt au lieu de 24 nt (Nuthikattu *et al.*, 2013).

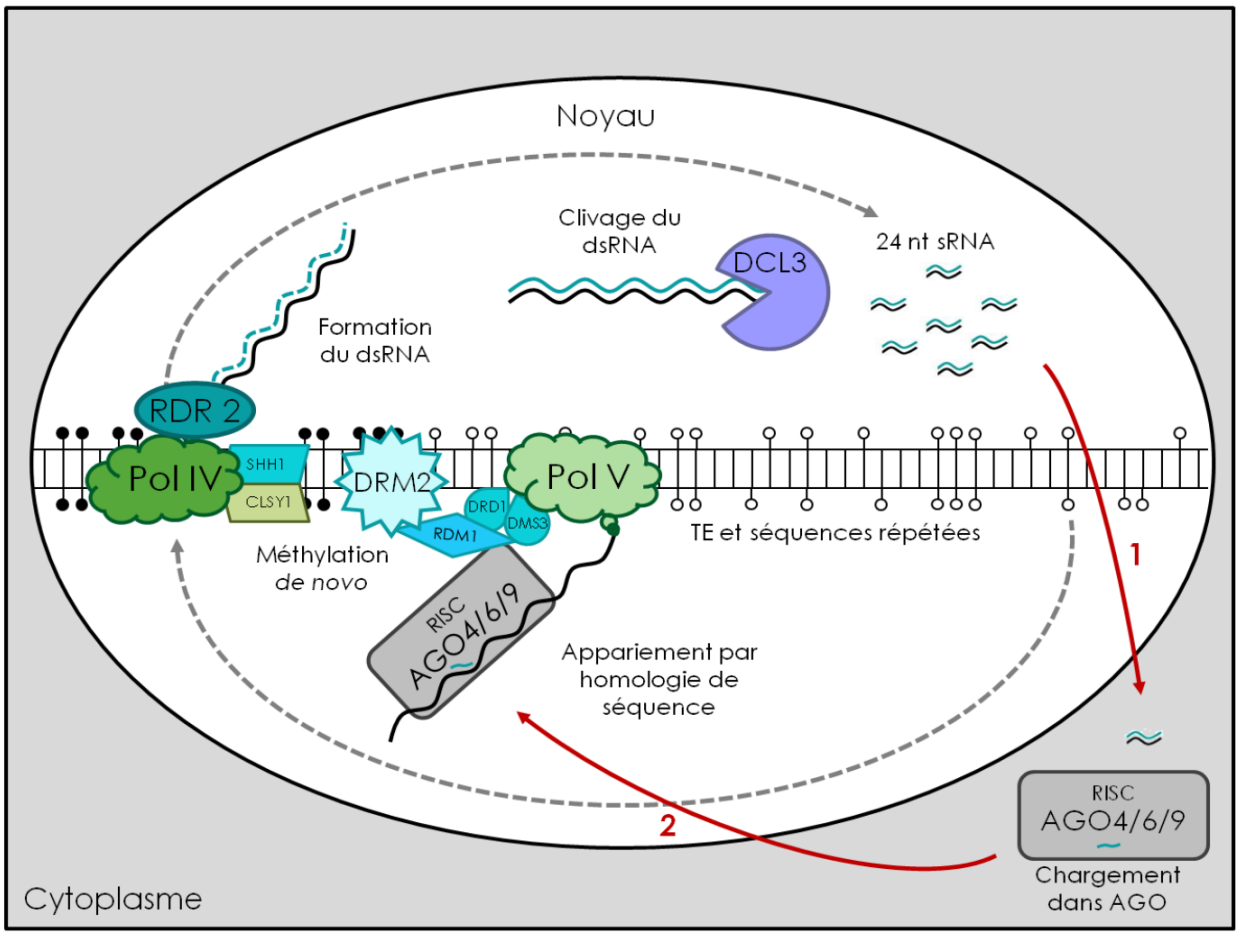


Figure 1.10 : Modèle de la voie du RdDM chez les plantes. L'établissement du RdDM implique la transcription des éléments transposables (TE) et des séquences répétées en ARN non codants et simple brin par la Polymérase IV (Pol IV). Le positionnement de Pol IV sur ses cibles implique CLSY1 and SHH1. RDR2, une ARN polymérase dépendante de l'ARN, interagit physiquement avec la Pol IV et permet la synthèse du brin complémentaire du transcrit de la Pol IV. L'ARN double brin (dsRNA) ainsi produit est clivé, dans le noyau, en petits duplexes d'ARN de 24 nucléotides (24 nt sRNA) par DCL3. Les duplexes de 24 nt sRNA sont ensuite exportés dans le cytoplasme (flèche rouge, 1), où ils sont chargés à l'état simple brin dans une protéine effectrice Argonaute (AGO4, AGO6 ou AGO9) impliqué dans le complexe RISC. Ce complexe est alors importé dans le noyau (flèche rouge, 2), où il va scanner le génome à la recherche de transcrits naissants de la Polymérase V (Pol V), complémentaire au sRNA chargé. Le complexe DDR, comprenant DRD1, DMS3 et RDM1, forme un pont entre le sRNA lié à AGO et l'ADN méthyltransférase *de novo* DRM2, qui catalyse la méthylation ADN de novo (sucette noire). Une fois établie, la voie RdDM est un processus robuste pouvant s'auto-renforcer (flèche en pointillés grise). Les cytosines non-méthylées sont représentées par les sucettes blanches.

Le maintien de la méthylation CHH est envisagé comme une opération continue, dépendante du mécanisme d'initiation via les sRNA. De manière similaire à la phase d'établissement, la méthylation CHH est établie par DRM2 lors de la phase de maintien, qui est dirigée aux transcrits de la PolV par les sRNA chargés dans les protéines AGO (Wierzbicki *et al.*, 2009). Une autre alternative à la voie RdDM provient de l'établissement de méthylation CHH par CMT2 au niveau de séquences hétérochromatiniennes, facilité par DDM1 et dépendant de l'histone de liaison H1 (Zemach *et al.*, 2013).

2.2. Mobilité des petits ARN

Développement, résistance aux maladies et réponses au stress chez les organismes multicellulaires sont autant de processus qui dépendent du mouvement local et systémique de molécules signal variées, incluant des hormones, des facteurs de transcription et d'autres macromolécules. L'ARN était exclu de ces voies de signalisation en raison de sa susceptibilité de dégradation par des nucléases cellulaires, jusqu'à la découverte d'un signal de répression des gènes, initié par un transgène et dépendant de la similarité de séquence nucléotidique, pouvant se déplacer de cellule en cellule et sur de longues distances chez les plantes (Palauqui *et al.*, 1997). La possibilité d'ARN mobiles a été renforcée par la découverte que l'injection de dsRNA pouvait initier la répression par l'ARN (« RNA silencing »), locale ou systémique, chez *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1998).

Toutefois, la nature exacte du signal ou des signaux de répression est toujours sujette à débats. Manifestement il(s) semble(nt) contenir des acides nucléiques, plus certainement de l'ARN, afin d'assurer la spécificité de séquence. Cependant, s'il s'agit d'une molécule longue ou courte, simple ou double brin demeure incertain. De plus, il est possible qu'il existe plusieurs formes de signaux de répression (Melnyk *et al.*, 2011). Néanmoins, il apparaîtrait que des sRNA de 21-, 22- et 24-nt puissent être les porteurs du signal de silencing (pour revue Brosnan and Voinnet, 2011).

Le signal de silencing peut se déplacer de plusieurs manières :

- Par mouvement intracellulaire : à l'intérieur des cellules, le « RNA silencing » peut s'étendre d'un *locus* inducteur à des cibles homologues. Ce phénomène est appelé « *trans*-silencing » ou répression des gènes basée sur l'homologie de séquence. Il a été découvert chez la Drosophile suite à l'étude de la régulation de l'élément P, capable de transposer dans la lignée germinale en l'absence de sRNA transmis par la mère (Todeschini *et al.*, 2010).

- Par mouvement de cellule à cellule (**figure 1.11**) : des études sur le PTGS induit par un transgène ont démontré que le « RNA silencing » s'étendait dans un rayon de 10-15 cellules autour du point d'initiation (Himber *et al.*, 2003). Il est généralement admis aujourd'hui que ce mouvement entre cellules se fait par les plasmodesmes. Mais l'exemple du passage de miRNA artificiel (amiRNA) ciblant la GFP, entre la cellule végétative et les cellules germinales dans les grains de pollen en développement, semble indiquer qu'il existe d'autres mécanismes de transport, ces cellules n'étant pas connues pour posséder des plasmodesmes (Slotkin *et al.*, 2009).

- Par mouvement systémique (**figure 1.11**): la propagation du signal dans tout l'organisme et la présence de molécules d'ARN dans le phloème, indique que le signal transite probablement par le phloème et non le xylème (Yoo *et al.*, 2004). Environ 35 % des *loci* producteurs de siRNA, chez *Arabidopsis*, sont associés avec une mobilité à longue distance, soulignant l'importance de ce phénomène (Molnar *et al.*, 2010). Cette capacité de propagation de riborégulateurs dans toute la plante peut permettre (1) la coordination de l'adaptation de la plante entière à un signal environnemental perçu par seulement quelques cellules et (2) la résistance systémique aux virus (Parent *et al.*, 2012).

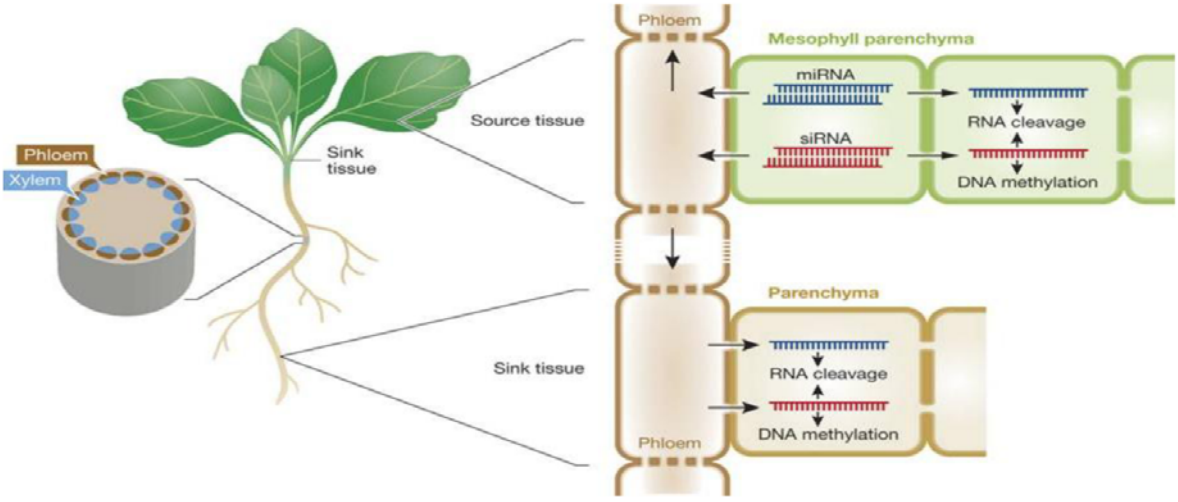


Figure 1.11 : ***Le mouvement des sRNA chez Arabidopsis***. Les sRNA produits dans les tissus photosynthétiques, dit « sources », se déplacent via le phloème jusqu'à leurs tissus cibles. Le phloème contient deux types de cellules : les cellules énuclées du tube criblé, qui permettent le passage des solutés, et les cellules compagnes, qui subviennent aux besoins des cellules du tube criblé. Dans les tissus cibles, les sRNA sont déchargés du phloème et se déplacent de cellule en cellule par les plasmodesmes. Melnyk *et al.*, 2011.

D. Les modifications post-traductionnelles des histones

Nous savons que les histones peuvent porter des modifications post-traductionnelles (MPT) depuis le début des années 1960, mais ce n'est qu'avec le cristal de 1997, que les scientifiques ont pu se faire une idée sur la manière dont ces modifications pouvaient influer sur la structure de la chromatine (Luger *et al.*, 1997). En effet, la structure a montré que les queues sortantes des histones pouvaient entrer en contact avec les nucléosomes adjacents, et que les MPT de ces queues pouvaient affecter ces interactions, et par conséquent, la structure totale de la chromatine. Nous savons maintenant que les queues, ainsi que les corps globulaires, des histones sont sujets à une large gamme de MPT. Ces modifications inclues la méthylation de résidus arginine (R) ; la méthylation, acétylation, ubiquitination, ADP-ribosylation et la sumoylation de résidus lysine (K) ; et la phosphorylation de sérines (S) et thréonines (T). Environ soixante résidus différents sur les quatre histones ont été identifiés comme porteur de modifications, soit par détection avec un anticorps spécifique, soit par spectrométrie de masse (Kimura *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2007a). Cependant, il semblerait que le nombre de résidus modifiables soit sous-estimé (Zhang *et al.*, 2007a; Britton *et al.*, 2011) (**figure 1.12**).

L'établissement de la plupart de ces MPT résulte d'un processus dynamique, et des enzymes spécifiques permettant l'ajout et le retrait de ces modifications ont été identifiées. La spécificité des enzymes de modification des histones peut aussi être influencée par d'autres facteurs : (1) la présence au sein de complexes protéiques peut spécifier une préférence pour les histones associés en nucléosome plutôt que libres, comme cela a été montré chez l'humain pour LSD1, dont l'association avec les nucléosomes nécessite le complexe CoREST (Lee *et al.*, 2005) ou (2) l'association à d'autres protéines peut affecter la sélection du résidu à modifier, comme chez l'humain où la présence de ASH2L est requise pour la triméthylation H3K4 par MLL (Steward *et al.*, 2006).

Cependant, il est à noter que toutes ces modifications ne sont pas présentes sur une même histone au même moment. L'apposition d'une ou plusieurs modification(s) à un instant donné va dépendre de la signalisation à l'intérieur même de la cellule. La combinaison de ces différentes MPT, aussi appelé "code des histones", va entraîner une réponse spécifique. Les modifications que nous détaillerons dans la suite de ce manuscrit sont l'acétylation, la phosphorylation, l'ubiquitination et enfin la méthylation des histones, sur laquelle nous nous arrêterons plus en détails.

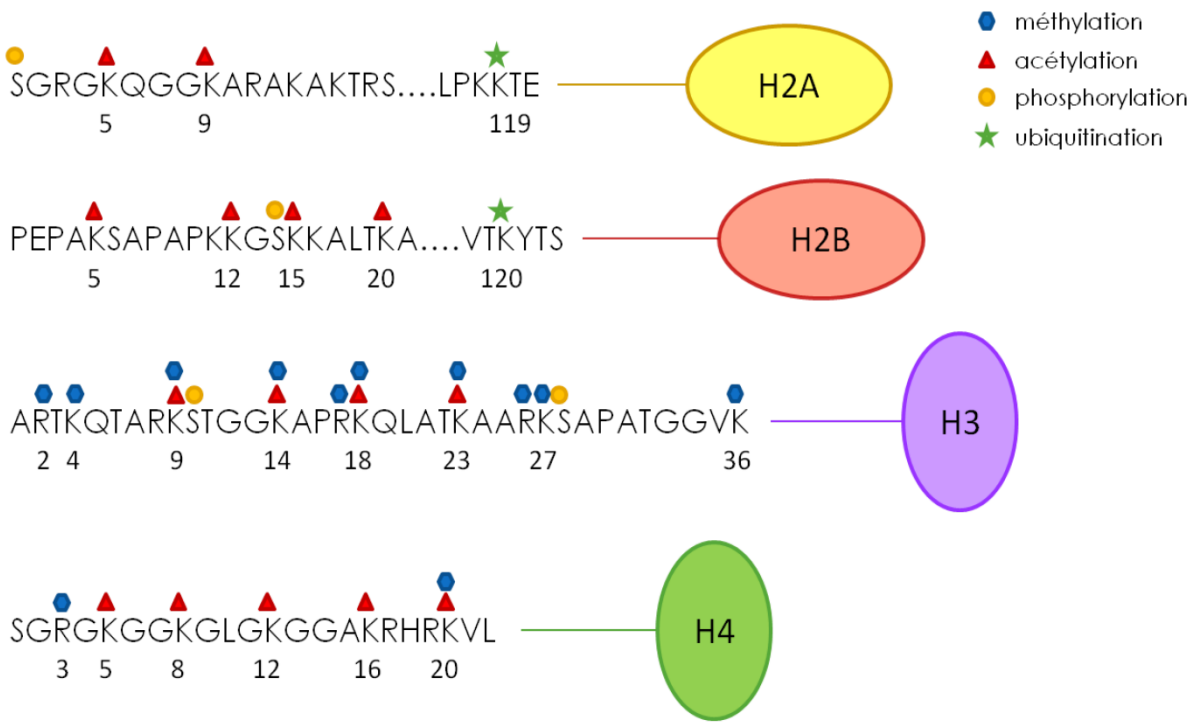


Figure 1.12 : ***Principales modification post-traductionnelles des histones du cœur chez les plantes.*** Ces modifications incluent l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation et l'ubiquitination. La méthylation H3K14, H3K18, H3K23 et l'acétylation H4K20 sont des marques spécifiques des plantes connues à ce jour.

III. DYNAMIQUE DES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES HISTONES

A. L'acétylation

L'acétylation des histones a été la première modification des histones a être décrite. Son étude a révélé une association entre histones hyperacétylées et gènes activement transcrits, pointant un rôle de l'acétylation des histones dans la facilitation de la transcription. En effet, les résidus lysines de la queue amino-terminale des histones sont chargés positivement et ces charges positives interagissent, grâce à des liaisons électrostatiques, avec les charges négatives portées par les phosphates de l'ADN. L'ajout d'un groupement acétyle entraine alors la neutralisation des ces charges positives, affaiblissant ainsi les interactions entre histone et ADN avec pour conséquence une augmentation de l'accessibilité de l'ADN à la machinerie de transcription (pour revue Mizzen and Allis, 1998). L'acétylation des lysines intervient aussi dans les autres processus cellulaires qui nécessitent un accès à l'ADN, tels la réplication et la réparation

de l'ADN (Unnikrishnan *et al.*, 2010; Xu and Price, 2011). De plus, il s'agit d'une MPT très dynamique et son homéostasie résulte d'un subtil équilibre entre les activités antagonistes des Histones AcétylTransférases (HAT), qui catalysent l'ajout d'un groupement acétyle, et des Histones DéACétylases (HDAC), qui retirent ces groupements.

1. Les histones acétyltransférases

Les HAT catalysent l'ajout d'un groupement acétyle à partir d'un acétyl-CoA donneur sur, de manière fréquente, plus d'un résidu lysine, résultant en une faible spécificité de substrat (Lee and Workman, 2007). Il existe deux classes majeures de HAT, basées sur leur localisation cellulaire (Mizzen and Allis, 1998) :

- Les HAT de type-B sont majoritairement cytoplasmiques et catalysent l'acétylation, particulièrement des résidus K5 et K12 des histones H4 nouvellement synthétisées avant leur incorporation dans la chromatine, après quoi ces marques sont enlevées (Parthun, 2007).

- Les HAT de type-A sont responsables de l'acétylation des histones nucléaires, et par conséquent, sont directement impliquées dans la régulation de l'assemblage de la chromatine et la transcription des gènes. Cette classe de HAT est subdivisée en plusieurs familles présentes chez de nombreux eucaryotes : GNAT, MYST, CBP/p300 et TAF1/TAF$_{II}$250, plus la famille supplémentaire SRC spécifique aux mammifères. Cette classe de HAT a été montrée comme étant impliquée dans la régulation de divers processus. C'est notamment le cas d'AtGCN5, une HAT de la famille GNAT chez *Arabidopsis*, dont le mutant *atgcn5* présente de graves défauts développementaux au niveau floral, suite à la répression de gènes de la machinerie des miRNA tels DCL1 et AGO1 (Bertrand *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2009). Deux HAT de la famille MYST ont quant à elles, été montrées comme essentielles à la formation du gamétophyte, le double mutant *ham1ham2* n'étant pas viable suite à des défauts de mitose lors du développement de celui-ci (Latrasse *et al.*, 2008).

2. Les histones déacétylases

En général, les HDAC ont peu de spécificité de substrat par elles-mêmes, une enzyme seule pouvant déacétyler de multiples positions. L'incorporation des HDAC au sein de complexes distincts permet une spécification du recrutement et une spécificité des résidus ciblés (Bannister and Kouzarides, 2011). Jusqu'à maintenant, quatre classes

de déacétylases ont été identifiées dans différentes espèces. Trois d'entre elles, les classes I, II et III, présentent des homologues chez les animaux, les plantes et la levure, tandis que la quatrième classe d'HDAC, celle des protéines HD2-like, semble être spécifique des plantes (Lusser *et al.*, 2001).

B. La phosphorylation et l'ubiquitination

La phosphorylation des histones, qui consiste en l'ajout d'un groupement phosphate de l'ATP au groupement hydroxyle de la chaine latérale des sérines et des thréonines ciblées, est un processus hautement dynamique. Les niveaux de phosphorylation sont contrôlés par des kinases et phosphatases, qui vont respectivement ajouter ou retirer cette modification (Oki *et al.*, 2007). La phosphorylation des histones est associée à des processus nucléaires très différents ; *a contrario*, peu est connu sur le rôle des phosphatases, mais au vu des roulements extrêmement rapide des phosphorylations spécifiques des histones, il doit y avoir une forte activité phosphatase à l'intérieur du noyau (pour revue Banerjee and Chakravarti, 2011).

L'ubiquitination des histones consiste en la fixation covalente sur les histones H2A et H2B, d'une petite (76 aa/8,5 kDA) protéine très conservée, l'ubiquitine et nécessite l'action conjointe de trois enzymes, E1-3. Si la poly-ubiquitination conduit à la dégradation de la protéine ciblée, la mono-ubiquitination, quant à elle, peut affecter la localisation subcellulaire et l'activité biochimique de la protéine modifiée. La mono-ubiquitination de H2A (H2Aub1) est nécessaire à la répression des gènes, alors que H2Bub1 est surtout associée à l'activation transcriptionnelle (Berr *et al.*, 2011). La précocité de floraison observée chez des mutants de cette voie est due à une perte de H2Bub1 au niveau de *FLC* s'accompagnant d'une baisse de son expression (Cao *et al.*, 2008).

C. La méthylation

La méthylation des histones consiste en l'ajout de groupement méthyles sur des résidus des queues N-terminales. Contrairement à l'acétylation et la phosphorylation, l'ajout de groupements méthyles n'altère pas la charge des histones. La méthylation des histones joue un rôle essentiel dans de nombreux et divers processus biologiques, allant de la régulation transcriptionnelle à la formation d'hétérochromatine. C'est l'une des

MPT les plus complexes car en plus de toucher plusieurs résidus, lysines et arginines, à plusieurs positions, elle diffère dans le nombre de groupements méthyles ajoutés.

1. Méthylation des arginines

Dernièrement, la méthylation des arginines a connu un regain d'intérêt compte-tenu de son implication dans des processus cellulaires, tels que la transcription, l'épissage de l'ARN, la transduction de signaux et la réparation de l'ADN (pour revue Molina-Serrano *et al.*, 2013). Cette PTM implique l'addition d'un ou deux groupements méthyles à partir de SAM sur les groupements guanidine des arginines, résultant en trois états différents de méthylation : monométhylé (Rme1), diméthylé asymétriquement (Rme2a) et diméthylé symétriquement (Rme2s) (**figure 1.13**) (Molina-Serrano *et al.*, 2013). La méthylation des arginines est catalysée par les arginine méthyltransférases (PRMT) et touche principalement les Arg2 (R2), R8, R17 et R26 de l'histone H3 et R3 de l'histone H4 (H4R3) (Liu *et al.*, 2010a). Chez les animaux, le résidu Arg3 de l'histone H2A (H2AR3) est aussi une cible des PRMT (Di Lorenzo and Bedford, 2011).

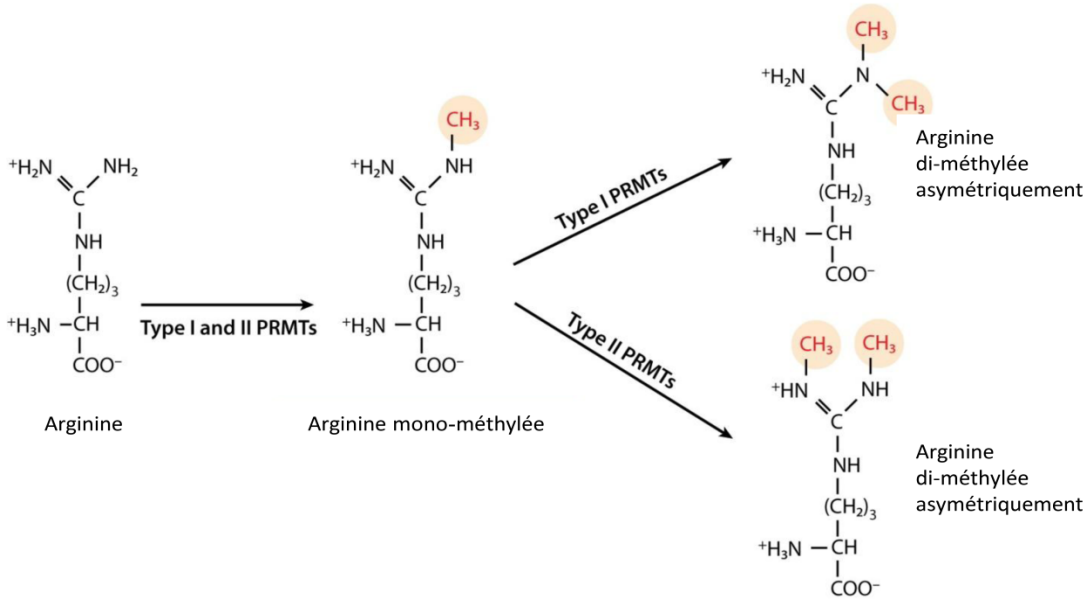


Figure 1.13 : ***Catalysation de la méthylation des arginines par les PRMT***. Les PRMT de type I génèrent la diméthylation asymétrique (Rme2a), tandis que les PRMT de type II génèrent la diméthylation symétrique (Rme2s). Adapté de Liu *et al.*, 2010.

Les PRMT sont divisées en deux groupes : les enzymes de type-I et les enzymes de type-II. Ces deux types de PRMT catalysent la mono-méthylation des arginines comme intermédiaire. Puis, les enzymes de type-I permettent la formation de Rme2a, tandis que les enzymes de type-II permettent celle de Rme2s (Molina-Serrano *et al.*, 2013). Chez *Arabidopsis*, neuf PRMT ont été identifiées, dont AtPRMT4a et AtPRMT4b, comme des méthyltransférases H3R2me2a, H3R17me2a et H3R26me2a *in vitro* et H3R17me2a *in vivo* (Niu *et al.*, 2008). H4R3 peut aussi bien être diméthylée symétriquement par AtPRMT5/SKB1, que asymétriquement par AtPRMT10 (Niu *et al.*, 2007). Le mutant *atprmt5* présente des phénotypes pléiotropiques, dont un retard de croissance, suggérant un rôle prépondérant d'AtPRMT5/SKB1 dans plusieurs processus développementaux, dont le maintien du méristème apical caulinaire (Pei *et al.*, 2007; Yue *et al.*, 2013).

De plus, une large gamme de protéines, autres que les histones, ont été identifiées comme étant des substrats des PRMT. Notamment PRMT4/CARM1 chez les animaux, qui serait capable de méthyler *in vitro* comme *in vivo* la partie N-terminale de l'histone acétyltransférase CBP (Chevillard-Briet *et al.*, 2002). L'identification de plus de substrats *in vivo* des PRMT permettrait donc d'expliciter les mécanismes moléculaires expliquant comment la modification des arginines participe à la régulation de l'expression des gènes.

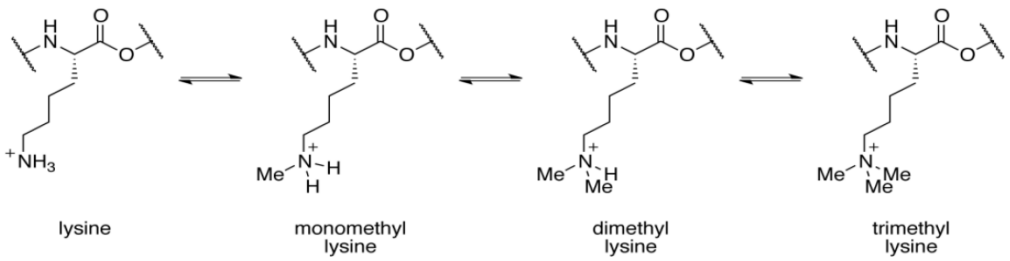


Figure 1.14 : ***Degré de méthylation des lysines catalysés par les Lysine MethylTransferase (KMT)***. Schéma montrant les différents niveaux de méthylation.

2. Méthylation des lysines

La méthylation des lysines des histones est une marque épigénétique importante et complexe, retrouvée aussi bien au niveau de domaines chromatiniens transcriptionnellement actifs que réprimés. La spécification de la chromatine se fait dépendamment du résidu lysine méthylé et du niveau de méthylation. L'ajout d'un (me1), deux (me2) ou trois (me3) groupements méthyles est catalysé par les histones lysines méthyltransférases (HKMT) (**figure 1.14**). La source des groupements méthyles est aussi la SAM**.** La méthylation des lysines n'affecte pas la charge nette des résidus modifiés, mais augmente l'hydrophobicité et peut perturber les interactions intra- et intermoléculaires, ou créer de nouvelles surfaces de liaisons pour des protéines de reconnaissance des MPT (Liu *et al.*, 2010a).

La méthylation des lysines survient principalement au niveau des queues des histones, sur les Lys4 (K4), K9, K27 et K36 de l'histone H3, et K20 de l'histone H4 (H4K20). Contrairement à *Arabidopsis*, la Lys79 (K79) de l'histone H3, située dans le corps globulaire, peut aussi être méthylée chez les animaux (Zhang *et al.*, 2007a). En outre, il a été montré chez *Arabidopsis*, par rapport à l'humain et la souris, de plus forts niveaux de méthylation H3K4me2 et de plus faibles niveaux de méthylation H3K9me2 et H3K9me3 (Jackson *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2006). La méthylation des histones est assurée par des membres de la famille des protéines à domaine SET. Sept sous-familles principales de protéines à domaine SET ont été identifiées chez l'humain, plus quelques membres orphelins (Dillon *et al.*, 2005). Chez *Arabidopsis*, la famille SET est subdivisée en quatre groupes, basées sur l'homologie de leur domaine SET avec ceux des protéines de levure et humaines, les caractéristiques de leur domaine SET, leur région riche en cystéine et leurs autres domaines conservés. Ces quatre catégories sont : (1) le groupe des SU(VAR)3-9 [incluant les protéines « SU(VAR)3-9 homologs » (SUVH) et les protéines « SUV(VAR)3-9 related » (SUVR)] ; (2) les homologues de E(Z) (Enhancer of Zeste) ; (3) le groupe des protéines TRX (Trithorax) [incluant les homologues de TRX et les protéines TRX-related] et (4) le groupe des protéines ASH1 (Absent, Small or Homeotic discs 1) [incluant les protéines « ASH1 homologs » (ASHH) et les « ASH1-related » (ASHR)] (Zhao and Shen, 2004; Baumbusch *et al.*, 2001). La fonction de chaque classe sera présentée en détails dans les paragraphes suivants.

D. Relation entre les différentes modifications post-traductionnelles

Le large spectre de MPT des histones possibles ouvre la voie à un contrôle strict de la structure de la chromatine. Cependant un autre niveau de complexité existe, dû aux interactions existant entre ces modifications (**figure 1.15**). Ces interactions peuvent se faire de multiples façons. (1) Il peut y avoir un antagonisme compétitif entre des modifications différentes, ciblant un même site. Cela est particulièrement vrai pour les lysines qui peuvent être méthylées, acétylées ou ubiquitinylées. (2) Une modification peut être dépendante d'une autre. Chez *S. cerevisiae*, H3K4me et H3K79me sont dépendantes de H2BK123ub. (3) La liaison d'une protéine sur une modification particulière peut être empêchée par une modification adjacente. C'est le cas pour HP1 chez les animaux, dont la liaison à H3K9me2/3 est perturbée par la phosphorylation H3S10. (4) L'activité d'une enzyme peut être affectée par une modification de son substrat. (5) Une coopération entre des modifications peut avoir lieu afin de recruter efficacement des facteurs spécifiques (Bannister and Kouzarides, 2011).

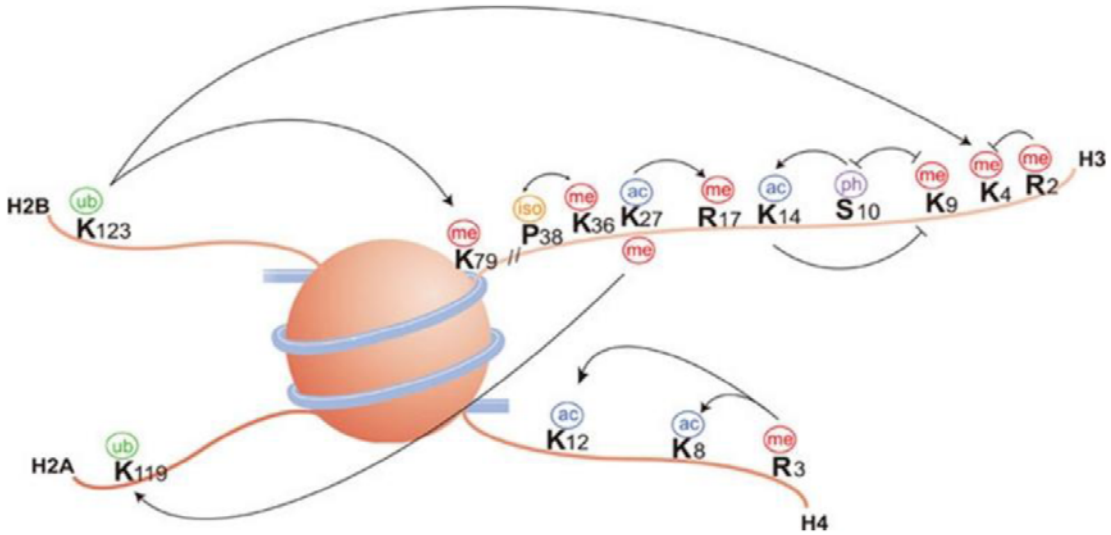


Figure 1.15 : ***Interaction entre les différentes MPT des histones***. Exemple des différentes interactions existant chez les mammifères et les levures. Des MPT peuvent positivement ou négativement impacter d'autres modifications. Un effet positif est indiqué par une flèche et un effet négatif par un trait. Bannister and Kouzarides, 2011.

De plus il apparait que certaines marques, ayant des effets antagonistes et ciblant des résidus différents, sont mutuellement exclusives. C'est le cas notamment chez l'homme de H3K4me et H3K9me (Nishioka *et al.*, 2002). Cette exclusion peut être due au recrutement d'enzymes par une des marques, capables d'enlever l'autre. La protéine humaine JMJD2A par exemple est capable de reconnaître et lier la méthylation H3H4me3 via son domaine Tudor et d'agir sur H3K9me et H3K36me (Huang *et al.*, 2006).

Pour H3K4me et H3K27me, bien qu'associées à des états de transcription contraires, il a été montré qu'elles pouvaient être présentes en même temps au niveau du promoteur de gènes réprimés dans des cellules souches humaines. Ces régions enrichies en gènes de développement ont été appelées « domaine bivalent » (Bernstein *et al.*, 2006; Mikkelsen *et al.*, 2007). Par comparaison avec des cellules différenciées, il a été montré que la majorité des domaines bivalents étaient résolus une fois la différenciation terminée, soit avec H3K4me3 associée à une forte transcription, soit avec H3K27me3 associée à la répression du gène. Un modèle a été proposé dans lequel cette bivalence aurait pour rôle de garder ces gènes « prêts » pour une future activation transcriptionnelle suite à l'induction d'une voie spécifique. Le maintien d'un ratio H3K4me/H3K27me au niveau de ces gènes est alors nécessaire. Chez *Arabidopsis*, c'est notamment le cas de gènes de réponse à l'éthylène comme *ChiB*, sur lequel sont présents à la fois H3K27me3 et H3K4me3 (Hu *et al.*, 2011).

IV. RÔLE ET DYNAMIQUE DE LA MÉTHYLATION DES HISTONES

A. Fonctions

1. Dualité de la méthylation H3K27 : entre formation de l'hétérochromatine et développement

En fonction du niveau de méthylation de H3K27 (mono-, di- ou triméthylé), cette marque pourra être associée à la répression des gènes, telle H3K27me3 qui est retrouvée au niveau de l'euchromatine sur des gènes important pour franchir les étapes du développement, aussi bien chez les animaux que chez les plantes, ou à une forte activité transcriptionnelle, telle H3K27me2 chez *Arabidopsis* (Park *et al.*, 2012) et H3K27me1 chez la souris (Ferrari *et al.*, 2014). Chez *Arabidopsis*, H3K27me1 est associée à l'hétérochromatine constitutive (Mathieu *et al.*, 2005) et établie par ATXR5 (*ARABIDOPSIS TRITHORAX-RELATED PROTEIN 5*) et ATXR6, qui sont les seules enzymes dont la fonction de mono-méthylation de H3K27 a été prouvée biochimiquement (Jacob *et al.*, 2009).

L'étude du double mutant *atxr5 atxr6* a par ailleurs montré la présence conjointe des MPTs H3K27me1 et H3K9me2 sur des *loci* communs sans cependant affecter la méthylation ADN ou la distribution globale de H3K9me2 (Jacob *et al.*, 2009).

La méthylation H3K27me3 quant à elle, est catalysée chez les animaux par E(Z), une histone méthyltransférase à domaine SET présente au sein du complexe répresseur polycomb 2 (PRC2), composé de ESC (Extra Sex Comb), E(Z) (Enhancer of Zeste), SU(Z)12 (Supressor of Zeste 12), et p55 (Czermin *et al.*, 2002). Cette marque va être reconnue par le chromodomaine de la protéine *POLYCOMB* (PcG), la sous-unité principale du complexe PRC1. Le recrutement aux régions de faible densité en nucléosomes et l'action conjointe de ces deux complexes permet l'établissement et le maintien de cette marque (Schwartz *et al.*, 2006; Kahn *et al.*, 2006).

Chez *Arabidopsis*, des homologues de chacun des composants du complexe PRC2 ont été identifiés, trois homologues de E(Z), *CURLY LEAF* (*CLF*), *MEDEA* (*MEA*) et *SWINGER* (*SWN*) ; trois homologues de Su(z)12, *FERTILIZATION-INDEPENDENT SEED 2* (*FIS2*), *EMBRYONIC FLOWER 2* (*EMF2*) et *VERNALIZATION 2* (*VRN2*) ; cinq homologues de p55, *MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA* (*MSI*) *1-5* ; et un homologue de Esc, *FERTILIZATION-INDEPENDENT ENDOSPERM* (*FIE*) (Pien and Grossniklaus, 2007), permettant la formation d'au moins trois complexes PRC2 distincts. Il n'existe cependant pas d'équivalent du complexe PRC1, révélant ainsi des mécanismes d'établissement et de propagation différents entre animaux et plantes (Zhang *et al.*, 2007b). De plus, l'analyse des profils globaux de cette marque a montré qu'un large nombre de gènes (~17 % des gènes codants) apparait comme marqué par cette MPT, indiquant que c'est un mécanisme de répression des gènes important (Zhang *et al.*, 2007b).

2. Méthylation H3K4 et protéines Trithorax

Les protéines de la famille Trithorax (Trx) peuvent apposer de un à trois groupement(s) méthyle(s) sur H3K4, et possèdent un rôle antagoniste des protéines PcG dans la régulation de l'expression des gènes homéotiques (HOX) chez les animaux. Les fonctions des gènes des familles Trx et PcG sont conservées chez les animaux et les plantes, avec les protéines PcG généralement requises pour le maintien d'un état répressif, et les protéines Trx généralement responsables du maintien d'un état actif (Avramova, 2009; Pien and Grossniklaus, 2007).

ARABIDOPSIS TRITHORAX 1 (*ATX1*), un homologue de l'histone méthyltransférase TRX, code pour une histone méthyltransférase active, spécifique de H3K4 (Alvarez-

Venegas *et al.*, 2003). Les mutants *atx1* présentent une réduction de 6-8 % du niveau de H3K4me2 et de ~15 % du niveau de H3K4me3 globales, indiquant que d'autres HKMT peuvent aussi catalyser la méthylation H3K4 (Alvarez-Venegas and Avramova, 2005). Effectivement, le génome d'*Arabidopsis* code pour cinq homologues de TRX (ATX) et sept protéines TRX-related (ATXR), dont *ATX2*, un paralogue d'*ATX1* résultant d'une duplication chromosomique (Baumbusch *et al.*, 2001; Saleh *et al.*, 2008). Cependant, la mutation d'*ATX2* n'entraine aucun défaut visible et les patrons d'expression d'*ATX1* et *ATX2* sont différents. De plus *ATX1* est principalement requis pour la méthylation H3K4me3, tandis qu'*ATX2* est responsable de H3K4me2, suggérant que ces deux gènes possèdent des fonctions divergentes (Saleh *et al.*, 2008). ATXR3/SDG2 est la principale méthyltransférase impliquée dans la méthylation H3K4me3 et est cruciale pour le développement du gamétophyte et du sporophyte (Berr *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2010; Yao *et al.*, 2013).

La distribution génomique de la méthylation H3K4 révèle un fort enrichissement des régions géniques en H3K4me1/2/3 et une déplétion au niveau des transposons. De plus, les niveaux de H3K4me3, mais pas H3K4me1/2, sont corrélés positivement à l'abondance de transcrits chez *Arabidopsis*. H3K4me1/2 sont présentes sur des gènes actifs et inactifs, tandis que H3K4me3 est exclusivement présente sur des gènes actifs chez *Arabidopsis* (Zhang *et al.*, 2009). H3K4me1 est enrichie au niveau du corps du gène, avec un biais apparent pour la région 3' chez *Arabidopsis*, alors que H3K4me2 et H3K4me3 sont plutôt retrouvées au niveau du promoteur et de la région 5' de la région transcrite (Zhang *et al.*, 2009).

3. Méthylation H3K36 et protéines de la famille ASH1

Le résidu H3K36 est spécifiquement méthylé par l'histone méthyltransférase ASH1 chez les mammifères et la Drosophile, et les MPTs H3K36me2/3 sont liées à l'élongation de la transcription (Berger, 2007; Li *et al.*, 2007). Quatre homologues d'ASH1 et trois protéines ASH-related sont présentes chez *Arabidopsis* (Baumbusch *et al.*, 2001). Parmi elles, l'activité de méthyltransférase de SDG8, SDG26 et SDG4 a été identifiée *in vitro* ou *in vivo* (Cartagena *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2005). SDG8 est la principale méthyltransférase H3K36 requise *in vivo* pour la méthylation H3K36me2/3 globale (Dong *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008). SDG8 est impliquée dans l'activation de l'expression des gènes *FLC* et *MADS AFFECTING FLOWERING* (*MAF*), tandis que SDG26 est nécessaire à leur répression, possiblement de manière indirecte (Xu *et al.*, 2008). SDG4 code pour une

protéine ASH-related et est fortement exprimé dans le pollen. Dans mutant *sdg4*, les niveaux de H3K36me2 et H3K36me3 sont grandement réduits dans le noyau végétatif et la longueur du tube pollinique est diminuée, SDG4 pourrait donc contrôler la croissance du tube pollinique en régulant les expressions de gènes spécifiques du pollen via la méthylation des histones (Cartagena *et al.*, 2008).

4. Méthylation des histones H3K9 et méthylation ADN : des processus liés

Chez les animaux, la méthylation H3K9 peut se faire sur les trois niveaux : mono- (H3K9me1), di- (H3K9me2) et tri-méthylation (H3K9me3) et chaque niveau va avoir des conséquences différentes (Martin and Zhang, 2005). Chez *Arabidospsis*, la méthylation H3K9 existe de manière prépondérante sous les formes H3K9me1 et H3K9me2, avec peu de H3K9me3 détectable. Les chromocentres sont enrichis en H3K9me1 et H3K9me2, indiquant une conservation de ces MPT des histones au niveau de l'hétérochromatine entre les différentes espèces. En accord avec sa fonction répressive des éléments transposables, H3K9me2 est retrouvée au niveau de ces derniers et des séquences répétées. Contrairement à H3K9me2, H3K9me3 est retrouvé au niveau de l'euchromatine (Liu *et al.*, 2010a).

KRYPTONITE (KYP), aussi connue sous l'appellation SUVH4, a été la première KMT de plante identifiée (Jackson *et al.*, 2002). Contrairement à son homologue SU(VAR)3-9, KYP ne possède pas de chromodomaine dans la partie N-terminale mais un domaine YDG/SRA de liaison à la chromatine et ne peut ajouter, *in vitro*, qu'un ou deux groupements méthyles à H3K9. Dans le mutant *kyp*, l'accumulation de H3K9me2 au niveau des foci d'hétérochromatine est fortement diminuée, alors que celle de H3K9me1 n'est pas significativement affectée. KYP semble donc être la KMT majeure pour H3K9me2. SUVH5 et SUVH6 sont deux très proches homologues de KYP, capables de méthyler H3K9 *in vitro* et ayant une redondance partielle avec celle-ci (Liu *et al.*, 2010a).

La caractérisation de l'interaction entre méthylation H3K9 et méthylation de l'ADN a révélé que la diméthylation H3K9 était critique pour le maintien d'une répression transcriptionnelle à l'échelle du génome entier et pour sa stabilité (Vaillant and Paszkowski, 2007). La réduction des niveaux de H3K9me2 dans le mutant *kyp*, entraine la perte de méthylation ADN non-CG, catalysée par CMT3 (Jackson *et al.*, 2002). Différentes analyses ont montré un ciblage commun des éléments transposables par CMT3 et KYP à l'échelle du génome, ainsi qu'une coïncidence entre méthylation de

H3K9 et de CHG (Liu *et al.*, 2010a). Ces résultats démontrent que le maintien de la méthylation non-CG requiert la méthylation H3K9. De plus, il a aussi été montré que la méthylation de l'ADN elle-même renforce la méthylation H3K9 par une boucle de rétrocontrôle positif (**figure 1.16** ; Liu *et al.*, 2010a). Bien que la méthylation H3K9me2 soit essentielle pour la répression des éléments transposables, le triple mutant *kyp suvh5 suvh6* ne présente pas de défauts développementaux évidents, de même que la perte de fonction de *SUVH2*. Seule la combinaison de *suvh2 suvh9* avec *kyp* présente des défauts développementaux pléiotropiques, qui ressemblent à ceux constatés pour le triple mutant *drm1 drm2 cmt3*. Ces phénotypes sont causés par la dérépression de *SDC* (*Suppressor of drm1 drm2 cmt3*), un gène F-box, réprimé par l'action conjointe de la voie RdDM et CMT3 dans les plantes sauvages (Liu *et al.*, 2010a).

Les mécanismes qui lient la méthylation ADN à la méthylation des histones ont partiellement été élucidés par l'identification de protéines de liaison à l'ADN méthylé. Par exemple, le domaine YDG/SRA de KYP et SUVH6 se lie préférentiellement à l'ADN méthylé en CHG, suggérant un rôle de la méthylation ADN dans le recrutement des KMT H3K9 (Johnson *et al.*, 2007). Une fois recruté, le domaine SET de ces KMT va méthyler les histones adjacentes. D'autres protéines de la même famille, SUVH2 et SUVH9, contenant à la fois un domaine YDG/SRA et un domaine SET, capables de se lier à l'ADN méthylé dans les contextes CG et CHH respectivement, sont requises pour la méthylation via la voie du RdDM (Liu *et al.*, 2010a). Pris ensemble, ces résultats suggèrent l'existence d'une boucle d'auto-renforcement entre méthylation H3K9me2 et méthylation ADN, chez *Arabidopsis* (**figure 1.16**).

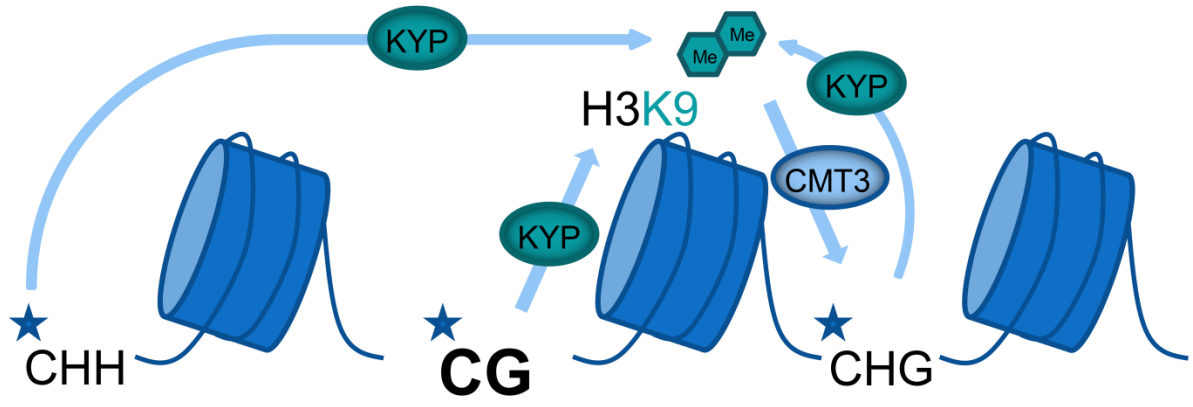


Figure 1.16 : ***Relation entre méthylation de l'ADN et méthylation H3K9***. Le maintien de la méthylation CHG est dépendante de la méthylation H3K9me2, qui à son tour est favorisée par la méthylation ADN, et surtout CHG. Il existerait donc une boucle de rétrocontrôle positif entre ces deux modifications épigénétiques.

En plus des protéines à domaine YDG/SRA, les protéines à domaine de liaison à l'ADN méthylé en CG (methyl-CG binding domain – MBD) représentent un autre groupe conservé de protéines chez les animaux et les plantes. Chez les animaux, MeCP2 se lie à l'ADN méthylé en CG et recrute diverses KMT, HDAC et autres facteurs de remodelage de la chromatine pour réprimer localement la transcription de la chromatine. Parmi les treize protéines MBD identifiées chez *Arabidopsis*, seules AtMBD5, AtMBD6 et AtMBD7 sont capables de reconnaître des sites de méthylation CG et de cibler préférentiellement les chromocentres, probablement recrutées par DDM1. Cependant, la caractérisation des protéines MBD est encore peu explorée (Grafi *et al.*, 2007).

B. Déméthylation des lysines

Contrairement à la déacétylation des histones, qui implique seulement l'hydrolyse d'une liaison amide, il a longtemps été pensé que la méthylation des histones était une marque irréversible, du fait de sa liaison carbone-azote. D'autres mécanismes de déméthylation sont possibles mais de manière indirecte et résultent d'un remplacement passif ou actif de l'histone méthylé(Mosammaparast and Shi, 2010). La découverte d'histones déméthylases (HDMT) a modifié ce point de vue. Deux classes de HDMT ont été découvertes : les enzymes de la famille LSD1, apparentées aux amines oxydases, et les enzymes de la famille Jumonji [JMJ, « croix » en japonnais, d'après la morphologie cruciforme de la crête neurale de souris mutantes (Takeuchi *et al.*, 1995)]. D'autres membres de ces deux classes ont ensuite été identifiés par homologie de séquence.

1. La famille LSD1

LSD1 (Lysine-specific déméthylase 1, aussi connu sous le nom KDM1) est la première HDMT découverte et appartient à la super famille des amines oxydases dépendantes du FAD (Flavine Adenine Dinucleotide) (Shi *et al.*, 2004). Découverte chez l'humain, elle avait été originellement identifiée comme un composant d'un complexe corépresseur de transcription, qui contenait aussi le corépresseur REST (CoREST) et les HDAC1/2 (Hou and Yu, 2010). LSD1 avait été proposé comme pouvant être elle-même un facteur de répression transcriptionnel, dont la fonction repose sur son domaine amine oxydase (AOD). Il a ensuite été montré que LSD1 était une déméthylase H3K4me1/2 (Shi *et al.*, 2004).

Chez les mammifères, la diminution de LSD1 par interférence ARN (RNAi) entraine l'augmentation de H3K4me2 au niveau des promoteurs de certains gènes de réponse au complexe REST, ainsi que l'activation de leur transcription (Shi *et al.*, 2004). Cette fonction de répression de la transcription de LSD1, via la déméthylation de H3K4me2, n'est pas limitée aux cibles du complexe REST, mais peut se faire au sein de nombreux autres complexes (Mosammaparast and Shi, 2010). Il a aussi été montré que la transcription des gènes dépendante des récepteurs aux œstrogènes et des récepteurs aux androgènes requiert la présence de LSD1, mais *via* cette fois la déméthylation de H3K9me2. Cependant, aucune déméthylation directe n'a pu être mise en évidence (Hou and Yu, 2010).

Il existe des homologues de LSD1 chez d'autres organismes, de la levure aux plantes, avec chaque organisme contenant au moins deux gènes apparentés à LSD1 (Mosammaparast and Shi, 2010). Pour la plupart de ces organismes, les homologues de LSD1 catalysent la déméthylation de H3K4me1/2, sauf pour *Schizosaccharomyces pombe*, dont les deux homologues déméthylent H3K9me1/2 (Hou and Yu, 2010).

Pour *Arabidopsis*, quatre homologues de LSD1 existent : FLOWERING LOCUS D (FLD), LSD1-LIKE (LDL1), LDL2 et LDL3. LDL1 a été caractérisée comme étant une H3K4me1/2 déméthylase, et LDL1, LDL2 et FLD sont toutes les trois impliquées dans la répression de *FLC*. En effet, dans les mutants *ldl1 ldl2* et *fld* une augmentation de H3K4me2 a pu être constatée au niveau du *locus FLC*, mais aussi FWA (Liu *et al.*, 2010a).

De part leur mécanisme enzymatique, les protéines de la famille LSD1 sont incapables d'assurer la déméthylation des lysines tri-méthylées (Shi *et al.*, 2004). Cette déméthylation est cependant rendue possible grâce aux protéines de la famille JMJ.

2. La famille JUMONJI

2.1. Découverte, mécanisme et spécificité

Le premier membre identifié de la famille Jumonji (JMJ), F-box and Leu-rich repeat protein 11 (FBXL11, aussi nommée JHDM1A et KDM2A), est une déméthylase H3K36me1/2 (Takeuchi *et al.*, 1995). Cette découverte a été suivie par l'identification de HDMT capables de déméthyler aussi les résidus tri-méthylés. Depuis, des HDMT de la famille JMJ (JHDM) possédant une activité envers H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H4K20, H3R2 et H4R3 ont été identifiées (Kooistra and Helin, 2012).

L'activité de déméthylation des protéines JMJ nécessite deux co-facteur, le Fe(II) et l'α-kétoglutarate (α-KG ou 2-OG). De plus, l'étude de cristaux de différentes JMJ humaines a permis de montrer que le domaine JmjC se composait de huit feuillets β, formant la poche catalytique active, à l'intérieur de laquelle trois acides aminés lient le co-facteur Fe(II) et deux autres lient l'α-KG. Ces acides aminés sont très conservés au sein de la famille JMJ (Klose *et al.*, 2006a) (**figure 1.17**).

En termes de spécificité, basée sur l'encombrement stérique dans la poche catalytique et l'accessibilité du substrat au site actif, les JHDM peuvent être séparée en deux groupes : les enzymes de type-I, spécifiques de la mono- et di-méthylation, et les enzymes de type-II, spécifiques de la di- et tri-méthylation (Tsukada, 2012).

En ce qui concerne la spécificité de résidu méthylé, les déterminants importants incluent la stabilité de l'interaction entre les JHDM et leur substrat, les domaines fonctionnels auxiliaires présents et la séquence locale au site de méthylation (Tsukada, 2012). L'analyse du cristal de la JHDM humaine JMJD2A en complexe avec différents peptides H3 a montré que c'était la séquence du peptide entourant le résidu Lys à

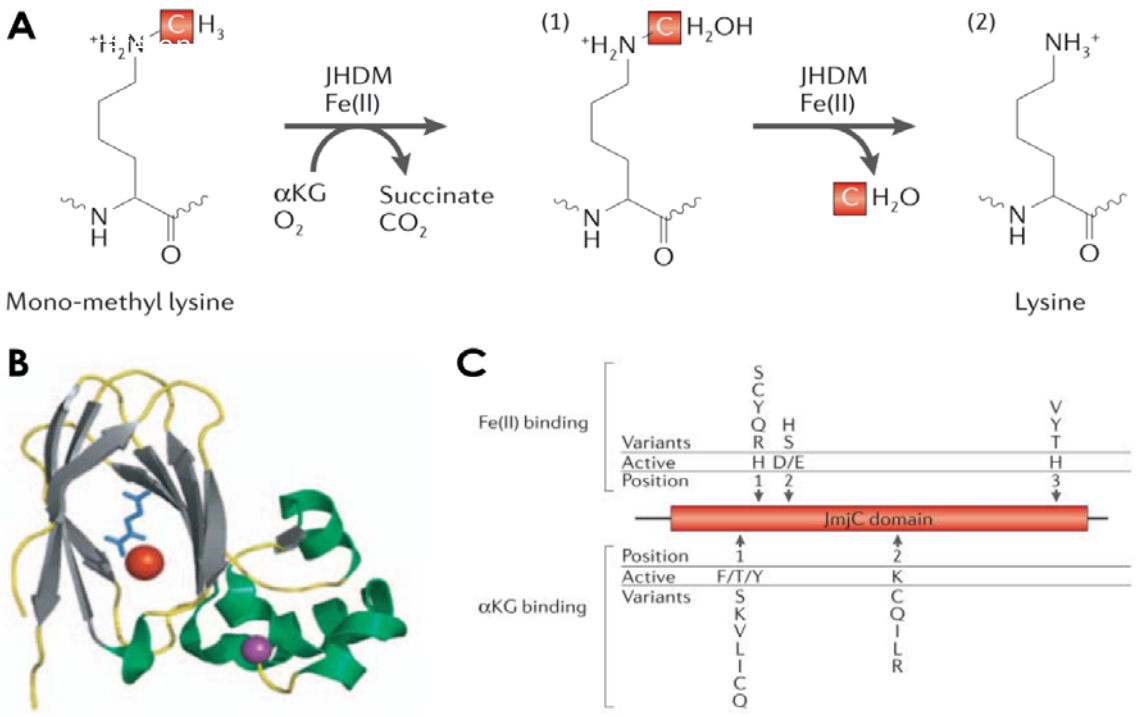


Figure 1.17 : ***Les déméthylases d'histone JMJ*** . (**A**) La famille des déméthylases JMJ déméthyle la mono- et di- et tri-méthylation. (**B**) Représentation de la structure tridimensionnelle du domaine JmjC de la protéine KDM4A. Les huits feuillets β sont représentés en gris, le Fe(II) en rouge et l'α-kétoglutarate en bleu. La région contenant les hélices α qui s'associe avec le zinc est représentée en vert, et la molécule de zinc en violet. (**C**) Représentation schématique du domaine JmjC montrant les positions des résidus nécessaires à la fixation du Fe(II) (haut) et de l'α-KG (bas). Adapté de Klose *et al.*, 2006.

déméthyler qui était importante pour la spécificité de substrat : pour H3K9me3, le substrat préférentiel de JMJD2A, deux résidus Gly à proximité semblent être importants pour acquérir la conformation requise, tandis que deux résidus Gly et une Pro procurent une spécificité de liaison avec H3K36me3 (Chen *et al.*, 2006; Ng *et al.*, 2007).

2.2. Fonctions

Des analyses phylogénétiques, basées sur la conservation du domaine JmjC (le domaine catalytique) des protéines JMJ humaines, ainsi que des 21 et 20 protéines JMJ que possèdent respectivement *Arabidopsis* et le riz, ont permis de définir huit groupes de protéines conservées au cours de l'évolution (Sun and Zhou, 2008). Certains de ces groupes sont spécifiques aux animaux (KDM2, KDM6 et KDM7) ou aux plantes, et d'autres communs (KDM3, KDM4, KDM5 et le groupe des protéines à domaine JmjC seul) (**figure 1.18**). Les JHDM de chaque clade identifié chez les animaux ne cible qu'un à trois résidus spécifiques (**Tableau 1.2**).

2.2.1. Clade KDM2 :

Des membres de ce groupe sont retrouvés de la levure à l'humain et ont été caractérisés comme des déméthylases H3K36 (Tsukada *et al.*, 2006). Les orthologues humain, murin et de la drosophile possèdent en plus du domaine JmjC, un domaine LRR (Leucine Rich Repeat), un domaine F-box et un domaine doigt de zinc CXXC. Des travaux récents indiquent qu'à l'échelle du génome, KDM2A (JHDM1A) est recruté au niveau d'ilots CpG non-méthylés, via son domaine CXXC et corrèle avec une déplétion sélective de H3K36me1/2 à l'intérieur de ces ilots mais pas dans les régions environnantes. *In vivo*, ce ciblage est aussi dépendant du niveau de densité en CpG (Blackledge *et al.*, 2010). Chez la souris, KDM2B a été trouvée dans un complexe avec des composants de PRC1 ainsi que le corépresseur BCOR, et sa mutation est létale (Sánchez *et al.*, 2007).

2.2.2. Clade KDM6

Il existe des orthologues des protéines KDM6 du ver à l'humain. La particularité de cette famille est la présence d'un domaine TPR (tétratricopeptide repeat) en plus de domaine JmjC (Klose *et al.*, 2006a). Chez les mammifères, ce clade consiste en KDM6A/UTX, UTY et KDM6B/JMJD3. Alors que des études *in vitro* ont montré que KDM6A

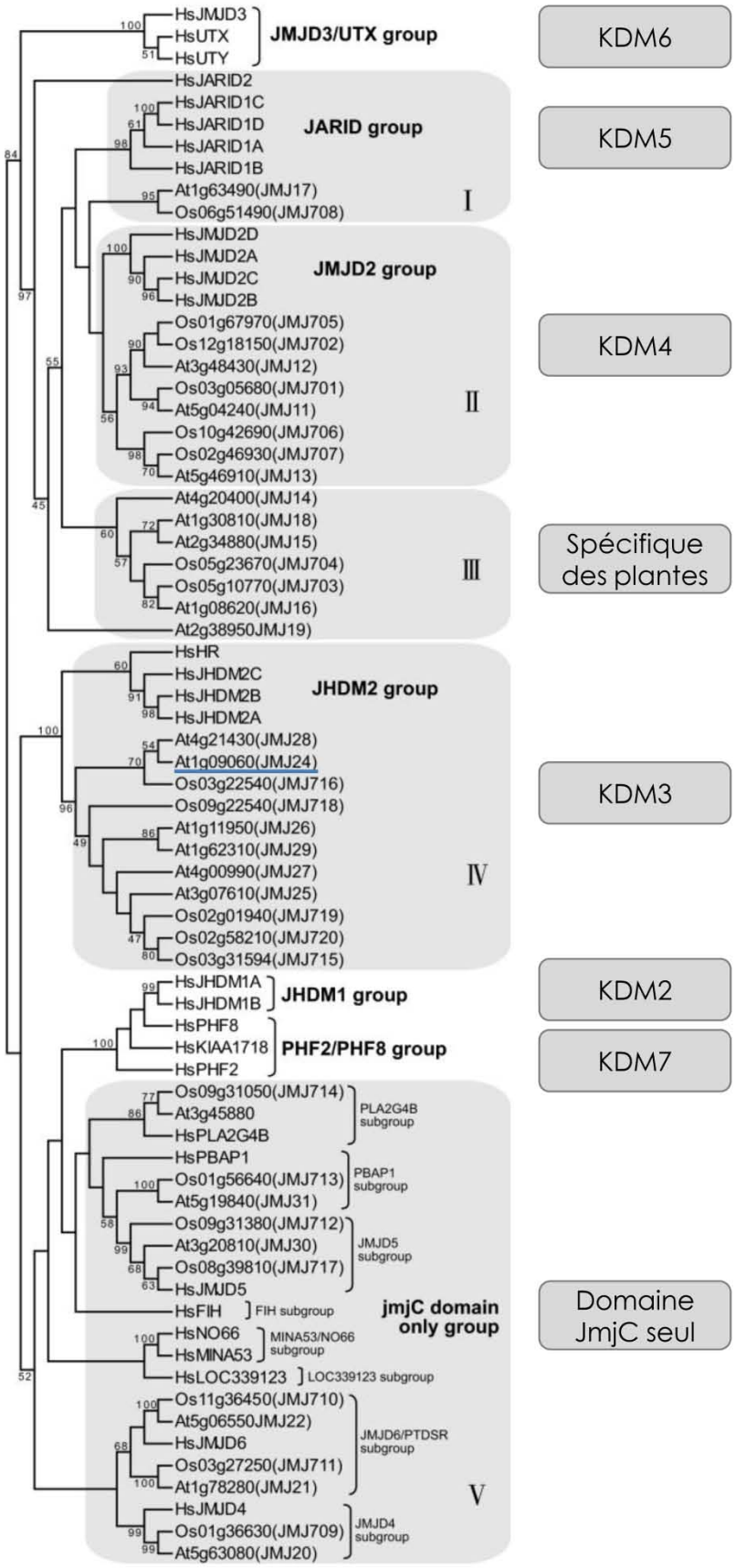


Figure 1.18 : **Relations phylogénétiques entre les protéines JMJ d'*O. sativa* (Os), d'*A. thaliana* (At), et de l'*H. sapiens* (Hs).** Adapté de Sun and Zhou, 2008.

et KDM6B sont des déméthylases H3K27me2/3, aucune activité pour UTY n'a été détectée jusqu'à maintenant (Agger *et al.*, 2007; Hong *et al.*, 2007).

De part leur spécificité de substrat, les protéines KDM6 vont jouer un rôle important dans le développement de l'organisme. En effet la déméthylation H3K27me3 par KDM6A et KDM6B est essentielle pour l'activation de gènes de lignage cellulaire en réponse aux signaux environnementaux (Morales Torres *et al.*, 2013). KDM6A est aussi nécessaire à la régulation des gènes *HOX* (Copur and Müller, 2013; Agger *et al.*, 2007). KDM6A et UTY semblent pouvoir aussi réguler l'activité des gènes de développement indépendamment de la fonction de déméthylation (Shpargel *et al.*, 2012). La transcription de *KDM6B*, contrairement à *KDM6A* exprimé de manière ubiquiste, est strictement régulée et est seulement induite à la suite de signaux de différentiation ou de signaux de stress dans différents contextes (Pedersen and Helin, 2010).

2.2.3. Clade KDM7/PHF

Les membres de ce groupe sont retrouvés du ver à l'humain, et possèdent en sus du domaine JmjC, un domaine PHD capable de se lier à H3K4me2/3 et une séquence NLS (Nuclear Localisation Signal). Les protéines du clade KDM7/PHF (Plant Homeodomain Finger protein) sont capables de déméthyler H3K9me1/2 et H3K27me1/2 et se composent de KDM7A, KDM7B et KDM7C impliqués dans le développement neuronal (Feng *et al.*, 2010; Tsukada *et al.*, 2010; Wen *et al.*, 2010). Il a été montré, *in vivo*, que KDM7B pouvait aussi déméthyler H4K20me1 (Liu *et al.*, 2010b), et que KDM7C ne devenait active qu'après phosphorylation (Baba *et al.*, 2011).

2.2.4. Clade KDM4

Les protéines de cette famille possèdent un domaine JmjN en plus du domaine JmjC, et d'autres domaines, PHD et Tudor chez les animaux et doigts de zinc chez les plantes. Les protéines KDM4 sont les premières à avoir été identifiée comme ayant une activité envers les lysines triméthylées. Quatre membres ont été identifiés chez les mammifères : KDM4A, KDM4B, KDM4C et KDM4D. Chez l'humain, il existe deux gènes supplémentaires, KDM4E et KDM4F, qui aurait été générés par rétrotransposition locale à partir de KDM4D (Katoh and Katoh, 2004). Les protéines de ce clade catalysent la déméthylation de H3K9me2/3 et/ou de H3K36me2/3 (Whetstine *et al.*, 2006; Klose, Yamane, *et al.*, 2006; Hillringhaus *et al.*, 2011). Le domaine Tudor de KDM4A, quant à lui, permet la reconnaissance et la liaison à H3K4me3 et H4K20me3 (Lee *et al.*, 2008).

Les protéines KDM4, et spécifiquement KDM4C, sont liées à la transformation maligne des cellules. En effet, des données d'expression montrent une surexpression de KDM4A, KDM4B et KDM4C dans le cancer de la prostate. KDM4C serait lié à l'activation transcriptionnelle corrélée à la déméthylation H3K9me3 au niveau des régions promotrices (Berry *et al.*, 2012; Cloos *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2011).

Chez *Arabidopsis*, trois membres ont été identifiés - AtJMJ13, AtJMJ12/REF6 et AtJMJ11/ELF6 - et cinq chez le riz - OsJMJ701, OsJMJ702, OsJMJ705, OsJMJ706 et OsJMJ707. Le domaine doigts de zinc spécifiques aux protéines KDM4 de plantes pourrait avoir une activité de liaison à l'ADN. Les protéines de plantes de ce groupe pourrait donc directement reconnaître une séquence spécifique d'ADN, définissant alors un nouveau type de répresseurs ou activateurs transcriptionnel, au lieu de corépresseurs ou co-activateurs (Lu *et al.*, 2008).

OsJMJ706 a été identifiée *in vitro* et *in vivo* comme étant une déméthylase H3K9me3 (Sun and Zhou, 2008). La perte de OsJMJ706 affecte le nombre d'organes floraux ainsi que le développement de la fleur et entraine une augmentation globale de la méthylation H3K9me2/3 (Sun and Zhou, 2008). *AtJMJ11/ELF6* (Early Flowering 6) et son proche homologue *AtJMJ12/REF6* (Relative of Early Flowering 6) jouent des rôles divergents dans le contrôle de la transition florale. La mutation de *JMJ11/ELF6* induit une précocité de floraison liée à une répression de l'expression de Flowering Locus T (FT) (Jeong *et al.*, 2009), tandis que celle de *JMJ12/REF6* induit un retard de floraison dépendant de *FLC* (Noh *et al.*, 2004). De plus, des données ont montré que l'activité de SDG8, une HMT spécifique de H3K4/H3K36, pouvait être contrebalancée par JMJ12/REF6, suggérant une implication de JMJ12/REF6 dans les déméthylation H3K36 (Chen *et al.*, 2011). Une autre étude a montré un rôle coopératif de JMJ11/ELF6 et JMJ12/REF6 dans la modulation de la signalisation en réponse aux brassinostéroïdes. Cette modulation se fait par interaction physique avec BES1 et coïncide avec une diminution de la méthylation H3K9me3, indiquant que JMJ11/ELF6 et JMJ12/REF6 pourrait être des déméthylases H3K9me3. Les propriétés biochimiques de JMJ11/ELF6 et JMJ12/REF6 restent cependant à élucider (Yu *et al.*, 2008). Récemment, l'étude de la surexpression transitoire de *JMJ12/REF6* dans les feuilles de tabac indique qu'elle serait également déméthylase H3K27me2/3 (Lu *et al.*, 2011a).

2.2.5. Clade KDM5

Les protéines du clade KDM5 contiennent les domaines JmjN, ARID (AT-rich interactive), doigts de zinc et plusieurs PHD, en supplément de domaine JmjC. Seule

Tableau 1.2 : ***Tableau des différents clusters de déméthylases eucaryotes et leurs substrats***.
Seule la famille KDM1 ne possède pas de domaine JMJ. Les substrats en gris sont sujets à controverse.

Famille	Déméthylase	Autres noms	Substrat(s)	Organisme
KDM1	KDM1A	LSD1, AOF2, BHC110	H3K4me1, H3K4me2	Humain
			H3K9me1, H3K9me2	S. pombe
	KDM1B	LSD2, AOF1	H3K4me1, H3K4me2	Humain
	LDL1		H3K4me1, H3K4me2	Arabidopsis
	LDL2		H3K4me2	Arabidopsis
	LDL3		H3K4me2	Arabidopsis
	FLD		H3K4me2	Arabidopsis
KDM2	KDM2A	FBXL11, JHDM1A	H3K36me1, H3K36me2	Humain
	KDM2B	FBXL10, JHDM1B	H3K36me, H3K36me2	Humain
			H3K4me3	
KDM3	KDM3A	JMJD1A, JHDM2A, TSGA	H3K9me1, H3K9me2	Humain
	KDM3B	JMJD1B	H3K9me1, H3K9me2	Humain
	KDM3C	JMJD1C	H3K9me1, H3K9me2	Humain
	HR	-	H3K9me1, H3K9me2	Humain
	JMJ24	AT1G09060	-	Arabidopsis
	JMJ25	IBM1, AT3G07610	H3K9	Arabidopsis
	JMJ26	AT1G11950	-	Arabidopsis
	JMJ27	AT4G00990	-	Arabidopsis
	JMJ28	B160, AT4G21430	-	Arabidopsis
	JMJ29	AT1G62310	-	Arabidopsis
	JMJ715	Os03g31594	-	Riz
	JMJ716	Os03g22450	-	Riz
	JMJ718	Os09g22540	-	Riz
	JMJ719	Os02g01940	-	Riz
	JMJ720	Os02g58210	-	Riz
KDM4	KDM4A	JMJD2A, JHDM3A	H3K9me2, H3K9me3	Humain
			H3K36me2, H3K36me3	
	KDM4B	JMJD2B, JHDM3B	H3K9me2, H3K9me3	Humain
			H3K36me2, H3K36me3	
	KDM4C	JMJD2C, JHDM3C, GASC1	H3K9me2, H3K9me3	Humain
			H3K36me2, H3K36me3	
	KDM4D	JMJD2D, JHDM3D	H3K9me3	Humain
	JMJ11	ELF6, AT5G04240	H3K9me3	Arabidopsis
	JMJ12	REF6, AT3G48430	H3K9me3	Arabidopsis
			H3K4, H3K36	
			H3K27me2, H3K27me3	
	JMJ13	AT5G46910	-	Arabidopsis
	JMJ701	Os03g05680		Riz
	JMJ702	Os12g18150		Riz
	JMJ705	Os01g67970	H3K27me2, H3K27me3	Riz
	JMJ706	Os10g42690	H3K9me2, H3K9me3	Riz
	JMJ707	Os02g46930		Riz

Tableau 1.2 (suite et fin): ***Tableau des différents clusters de déméthylases eucaryotes et leurs substrats***.
Seule la famille KDM1 ne possède pas de domaine JMJ. Les substrats en gris sont sujets à controverse.

Famille	Déméthylase	Autres noms	Substrat(s)	Organisme
KDM5	KDM5A	JARID1A, RBP2	H3K4me2, H3K4me3	Humain
	KDM5B	JARID1B, PLU1	H3K4me2, H3K4me3	Humain
	KDM5C	JARID1C, SMCX	H3K4me2, H3K4me3	Humain
	KDM5D	JARID1D, SMCY	H3K4me2, H3K4me3	Humain
	JARID2	-	-	Humain
	JMJ17	AT1G63490	-	Arabidopsis
	JMJ708	Os06g51490	-	Riz
KDM6	KDM6A	UTX	H3K27me2, H3K27me3	Humain
	KDM6B	JMJD3	H3K27me2, H3K27me3	Humain
	UTY	-	-	Humain
KDM7/PHF	KDM7A	KIAA1718, JHDM1D	H3K9me1, H3K9me2	Humain
			H3K27me1, H3K27me2	
	KDM7B	PHF8, JHDM1F	H3K9me1, H3K9me2	Humain
			H4K20me1	
	KDM7C	PHF2, JHDM1E	H3K9me2	Humain
JmjC-seul	JMJD4	-	-	Humain
	JMJD5	KDM8	H3K36me2	Humain
	JMJD6	-	H3R2, H4R3	Humain
	JMJD7	-	-	Humain
	JMJD8	-	-	Humain
	HIF1AN	-	-	Humain
	HSPBAP1	-	-	Humain
	NO66	-	H3K4me2, H3K4me3	Humain
			H3K36me2, H3K36me3	
	MINA	-	-	Humain
	JMJ20	AT5G63080	H3R2me	Arabidopsis
			H4R3me1, H4R3me2s	
	JMJ21	AT1G78280		Arabidopsis
	JMJ22	AT5G06550	H4R3me2s	Arabidopsis
	JMJ23	AT3G45880	-	Arabidopsis
	JMJ30	JMJD5, AT3G20810	-	Arabidopsis
	JMJ31	AT5G19840	-	Arabidopsis
	JMJ709	Os01g36630	-	Riz
	JMJ710	Os11g36450	-	Riz
	JMJ711	Os03g27250	-	Riz
	JMJ712	Os09g31380	-	Riz
	JMJ713	Os01g56640	-	Riz
	JMJ714	Os09g31050	-	Riz
	JMJ717	Os08g39810	-	Riz
Spécifiques des plantes	JMJ14	PKDM7B, AT4G20400	H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3	Arabidopsis
	JMJ15	MEE27, PKDM7C, AT2G34880	H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3	Arabidopsis
	JMJ16	PKDM7D, AT1G08620		Arabidopsis
	JMJ18	AT1G30810	H3K4me3	Arabidopsis
	JMJ19	AT2G38950		Arabidopsis
	JMJ703	Os05g10770	H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3	Riz
	JMJ704	Os05g23670		Riz

KDM5A et ses orthologues ne possèdent pas de domaine PHD (Klose *et al.*, 2006a). Les membres de cette famille interagissent avec l'ADN via leur domaine ARID, qui peuvent se lier à des séquences riches en CG [CCGCCC et GCAC(A/C)] (Tu *et al.*, 2008; Scibetta *et al.*, 2007). Cette interaction ARID/ADN peut s'avérer nécessaire à l'activité de déméthylase dans les cellules. Les différents domaines PHD peuvent se lier à différentes MPT : H3K4me0, H3K4me2, H3K4me3 et H3K9me3 (Upadhyay *et al.*, 2011). Les protéines KDM5 catalysent la déméthylation H3K4me2/3 (Christensen *et al.*, 2007). Chez les mammifères, cette famille se compose de KDM5A, KDM5B, KDM5C et KDM5D, contre une protéine chez *Arabidopsis*, AtJMJ17, et une chez le riz, OsJMJ708.

KDM5A semble liée à la régulation de la différentiation cellulaire, la progression du cycle cellulaire et le fonctionnement de la mitochondrie. KDM5A peut s'associer avec PRC2 et recruter le complexe au niveau de ces cibles (Pasini *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2009). KDM5B et KDM5D peuvent aussi interagir avec des protéines PcG ou PcG-like, indiquant une coopération entre les protéines KDM5 et PcG dans la répression transcriptionnelle (Zhou *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2007). *KDM5B* présente un patron d'expression réduit dans les tissus adultes, mais des niveaux d'expression forts ont été retrouvés dans des cancers du sein et de la prostate, supportant un rôle dans la transformation maligne. KDM5C serait considérablement lié au développement du cerveau (Pedersen and Helin, 2010).

2.2.6. Clade à domaine JmjC seul

Ce groupe de déméthylases est composé des protéines ne possédant aucun autre domaine protéique identifiable que le domaine JmjC. Il est composé de nombreuses protéines chez l'humain, de six protéines chez *Arabidopsis* et sept chez le riz. Ce groupe forme une branche à part entière et contient toutes les JHDM connues pour être cytoplasmiques (Klose *et al.*, 2006a). Par conséquent, ces protéines vont disposer d'une large gamme de substrats, dont certains autres que les histones.

Par exemple, JMJD6 qui a d'abord été décrite comme la première déméthylase à cibler les arginines méthylées (H3R2me2 et H4R3me2), aurait plutôt une activité de lysyl-hydroxylation du facteur d'épissage *U2AF2* (Chang *et al.*, 2007; Webby *et al.*, 2009). De même, la capacité première de JMJD5 à déméthyler H3K36me2, semble être remise en question (Del Rizzo *et al.*, 2012).

AtJMJ30 est impliquée dans la régulation des gènes dépendante du cycle circadien (Jones *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2011b; Jones and Harmer, 2011). Le fonctionnement de l'horloge circadienne repose sur une boucle de rétrocontrôle qui repose sur *TOCI* (Timing Of Cab1 expression 1), *CCA1* (Circadian Clock Associated 1) et *LHY* (Late elongated Hypocotyl) (Harmer, 2009). L'expression la nuit de *TOC1* permet l'activation au début de l'éclairement de *CCA1* et *LHY*, qui vont à leur tour réprimer *TOC1* (Alabadí *et al.*, 2001). Il a été montré que *JMJ30* possède le même patron d'expression que *TOC1* et qu'il est directement réprimé par *CCA1*, cependant *JMJ30* et *TOC1* semblent agir dans des voies génétiques parallèles bien qu'étroitement liées (Jones and Harmer, 2011). Son activité de déméthylase reste cependant à déterminer.

AtJMJ20 et AtJMJ22 ont quant à elles, été impliquées dans le contrôle positif de la germination après induction lumineuse, via une activité de déméthylation des arginines des histones (Cho *et al.*, 2012). *In vivo*, JMJ20 et JMJ22 sont capables de déméthyler H4R3me2s au niveau des gènes *Ga3ox1* et *Ga3ox2*, impliqués dans la voie de l'acide gibbérellique. *In vitro*, JMJ20 peut déméthyler H3R2me, H4R3me1 et H4R3me2s.

2.2.7. Clade spécifique des plantes

Ce clade comprend cinq protéines d'*Arabidopsis*, AtJMJ14, AtJMJ15, AtJMJ16, AtJMJ18 et AtJMJ19, et deux protéines de riz, OsJMJ703 et OsJMJ704. Ces protéines sont caractérisées par la présence des domaines JmjN, JmjC, zf-C5H2 et les domaines FYRN et FYRC en C-terminal. Ces deux derniers domaines sont normalement retrouvés dans les protéines TrX et leurs homologues. Il est à noter que JMJ19 est une protéine relativement courte, qui ne possède pas ces deux domaines. De plus, seule JMJ19 ne possède pas les acides aminés conservés pour la liaison des co-facteurs, suggérant qu'elle pourrait ne pas être une HDMT active (Lu *et al.*, 2008).

JMJ14 et JMJ15 ont été identifiées comme des déméthylases du résidu H3K4 et sont impliquées dans la régulation de la transition florale (Jeong *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2012a). En effet, la mutation de *JMJ14* résulte en une précocité de floraison, due à une augmentation de l'expression de *FT* associée à une augmentation des niveaux de méthylation H3K4me3 au niveau de ce *locus* (Jeong *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2010). Dans le cas de *JMJ15*, c'est sa surexpression qui va entrainer une précocité de floraison associée à la répression de *FLC* et une baisse de son niveau de méthylation H3K4me3 (Yang *et al.*, 2012a). Des tests in vitro et in vivo

ont montré que JMJ14, tout comme JMJ15, était aussi capable de déméthyler H3K4me1 et H3K4me2 (Jeong *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010a; Yang *et al.*, 2012a).

JMJ15 avait préalablement été identifié dans un crible de mutants déficients pour le développement du gamétophyte femelle et alors nommé *MEE27* (Maternal Effect Embryo arrest 27), suggérant un potentiel rôle de ce gène dans le système reproducteur (Pagnussat *et al.*, 2005).

JMJ14 possède aussi un rôle dans la régulation de la méthylation de l'ADN. En effet, la perte de fonction de *JMJ14* entraine une perte de la méthylation non-CG au niveau de gènes cibles du RdDM, tels *MEA-ISR*, *FWA* et *AtSN1*, mais pas *Ta3*, dont la méthylation est dépendante de CMT3 (Deleris *et al.*, 2010). De plus, l'introduction d'une copie exogène de *FWA* dans le fond mutant *jmj14* n'a pas pour conséquence l'apparition d'un phénotype de transition florale tardive, en comparaison avec une plante sauvage (Deleris *et al.*, 2010). Ceci suggère que *jmj14* n'affecte pas la méthylation *de novo*, mais son maintien par DRM2. Une autre étude a montré la nécessité de JMJ14 dans la répression de séquences cibles du RdDM (Searle *et al.*, 2010). Malgré une augmentation des transcrits de ces séquences et une perte de la méthylation non-CG, le mutant *jmj14* n'est pas affecté dans l'abondance en sRNA endogènes. *JMJ14* agirait donc en aval de la voie RdDM et pourrait altérer la balance entre processus activateurs et répresseurs par le retrait de la marque H3K4me3, possible inhibiteur de la méthylation ADN dépendante de DRM2 (Searle *et al.*, 2010). JMJ14 a aussi récemment été impliquée dans le mécanisme de PTGS. Son absence dans le mutant *jmj14* entraine une altération de ce mécanisme (Le Masson *et al.*, 2012).

Une récente étude a montré que JMJ18, une autre JHDM capable de déméthyler H3K4me3 *in vitro* et *in vivo*, était impliquée dans le contrôle de la transition florale via la répression de l'expression de *FLC* (Yang *et al.*, 2012b). *JMJ18* est exprimé dans les cellules compagnes du phloème et se lie directement au *locus FLC*, afin d'en réprimer l'expression.

Chez le riz, OsJMJ703 a aussi été identifiée comme une déméthylase H3K4, capable de déméthyler tous les niveaux de méthylation. La perte de fonction de ce gène conduit à une diminution de l'élongation de la tige et par conséquent une diminution de la taille de la plante (Chen *et al.*, 2013). Cette protéine semble donc jouer un rôle dans le contrôle de la croissance, mais joue aussi un rôle dans le contrôle de l'activité des transposons (Cui *et al.*, 2013).

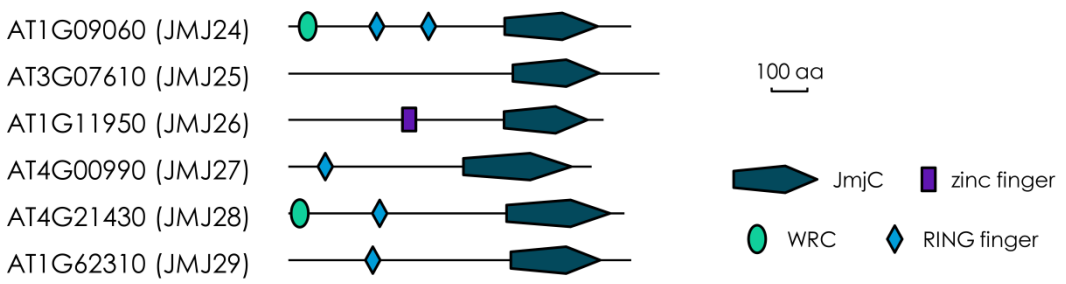


Figure 1.19 : **Caractéristique *structurelle des* JMJ d'*Arabidopsis***. Architecture en domaines des JMJ du clade KDM3.

2.2.8. Le clade KDM3

Tous les membres de ce clade caractérisés à l'heure actuelle possèdent une activité de déméthylation H3K9me (Brauchle *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013; Inagaki *et al.*, 2010; Saze *et al.*, 2008; Yamane *et al.*, 2006). La famille KDM3 chez les mammifères se compose de quatre membres : hairless (HR), KDM3A, KDM3B et KDM3C, tandis qu'*Arabidopsis* en compte six - JMJ24, JMJ25/IBM1, JMJ26, JMJ27, JMJ28 et JMJ29, et le riz cinq - OsJMJ715, OsJMJ716, OsJMJ718, OsJMJ719 et OsJMJ720. En plus du domaine JmjC, certains membres de cette famille présentent un domaine à doigts de zinc ou un domaine RING. C'est le cas notamment de JMJ24 qui possède deux domaines RING, connus pour être impliqués dans les interactions protéine-protéine et caractéristiques des protéines ligases E3, ainsi qu'un domaine WRC, caractérisé par un signal de localisation nucléaire (NLS) putatif et un motif doigt de zinc, suggérant une possible fonction dans la liaison à l'ADN (**figure 1.19**).

HR a d'abord été identifiée chez la souris puis chez l'humain, et sa mutation entraine une alopécie congénitale universelle (Ahmad *et al.*, 1998). Le domaine JmjC de HR est le plus divergent parmi au sein du groupe KDM3, et malgré le fait que tous les sites prédits de liaison aux co-facteurs, sauf un, présentent une substitution de résidu, elle présente quand même une activité de déméthylase H3K9me1/me2 (Liu *et al.*, 2013).

Récemment, JMJ25/IBM1 a été décrite, *in vivo*, comme étant une déméthylase H3K9 (Saze *et al.*, 2008; Inagaki *et al.*, 2010). La mutation d'*IBM1* entraine de sévères défauts développementaux, suggérant que la déméthylation H3K9 est essentielle au développement de la plante. L'augmentation de la méthylation ADN CHG, indépendante de la voie du RNAi, et les défauts développementaux dus à la

surméthylation H3K9 de gènes actifs, sont entièrement restaurés par la mutation de *KYP* ou *CMT3*. Cette augmentation de méthylation CHG n'est détectée qu'au niveau des gènes transcrits et non des éléments transposables (Miura *et al.*, 2009; Inagaki *et al.*, 2010). De plus dans les fonds mutants *kyp* et *cmt3*, les transposons réactivés peuvent alors être ciblés par IBM1, indiquant que la transcription des gènes est un prérequis au ciblage par IBM1.

IBM1 est aussi connu pour produire deux transcrits : une forme longue (*IBM1-L*), contenant le domaine JmjC, et une forme courte ne le contenant pas (Rigal *et al.*, 2012). L'accumulation du transcrit *IBM1-L* dépend de la présence et de l'état de méthylation CG et CHG d'une séquence répétée d'environ 500 pb contenue dans le large septième intron d'IBM1 (Rigal *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013).

V. DYNAMIQUE DE LA CHROMATINE : L'EXEMPLE DE FLC

La régulation de l'expression du gène *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*), codant un régulateur transcriptionnel à domaine MADS répresseur de la transition florale (Michaels and Amasino, 1999), est un parfait exemple de l'étude de l'intégration des différentes voies de régulation de la chromatine. En effet, l'activation transcriptionnelle de *FLC* repose sur la mise en place de modifications post-traductionnelles des histones et un remodelage de la chromatine. Ainsi la mutation d'un de ces différents acteurs entraine une dérégulation de *FLC* associée à une floraison précoce. Parmi les modifications post-traductionnelles des histones, il a été montré une présence au niveau de *FLC* de H2Bub1 (Schmitz *et al.*, 2009), H3K4me3/me2 à l'extrémité 5'(Tamada *et al.*, 2009), H3K36me3 à son extrémité 3' (Zhao *et al.*, 2005), H3K4ac et H4K5ac (He *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2013). Le complexe de remodelage SWR1/SRCAP, impliqué dans la substitution de l'histone H2A par son variant H2A.Z, joue également un rôle majeur dans l'expression de *FLC* (Deal *et al.*, 2007).

La répression transcriptionnelle de FLC quant à elle repose sur l'enrichissement en marques répressives, dont H3K27me3 et H3K9me2 (Bastow *et al.*, 2004), ainsi que H4R3sme2 (Niu *et al.*, 2007). En parallèle, une déacétylation active est induite par FVE et HDA6 (Ausín *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2011), ainsi qu'une déméthylation H3K4 active par plusieurs déméthylases JMJ (JMJ18 et JMJ15) (Yang *et al.*, 2012a ; Yang *et al.*, 2012b) et LSD1 (FLD, LDL1 et LDL2, Liu *et al.*, 2010). Enfin, LHP1 est requise pour le maintien de la répression de FLC (Mylne *et al.*, 2006).

VI. OBJECTIFS DE LA THESE

Depuis ces dernières années, les études portant sur la caractérisation des JMJ ont montré leur rôle prépondérant dans la régulation des gènes et le développement des organismes. Ces protéines sont organisées en plusieurs groupes phylogénétiques en fonction de la conservation de leur domaine catalytique. Pour chaque famille entre un et trois substrats spécifiques ont pu être identifiés chez les animaux. Plusieurs questions se posent alors : (1) cette spécificité de substrat, propre à chaque clade, est-elle retrouvée pour les membres identifiés chez *Arabidopsis* et le riz et (2) quelles sont leurs cibles génomiques et leurs rôles dans le maintien de l'intégrité du génome, l'expression des gènes et le développement de la plantes ? Mon travail de thèse est articulé en trois chapitres portant sur la caractérisation fonctionnelle de JMJ24, une protéine d'*Arabidopsis* de la famille KDM3, dont le substrat spécifique serait la méthylation H3K9.

L'objectif principal du premier chapitre de ma thèse a été de chercher à caractériser la fonction biologique de *JMJ24* en utilisant des outils de génétique inverse et de génomique fonctionnelle, à savoir (1) l'analyse phénotypique de mutants perte de fonction, (2) l'analyse de l'activité du promoteur par fusion transcriptionnelle avec le gène rapporteur GUS et (3) l'analyse de données transcriptomiques afin d'identifier de potentiels gènes et/ou voies génétiques cibles. Nos résultats indiquent un rôle ubiquitaire de JMJ24 tout en ayant une action vraisemblablement restreinte au niveau du phloème.

Le second chapitre de ma thèse porte sur l'analyse de l'implication de JMJ24 dans la méthylation des histones. Dans un premier temps, nous avons cherché à savoir si JMJ24 était capable d'interagir avec d'autres acteurs de cette voie, et plus particulièrement avec d'autres protéines JMJ. Puis nous nous sommes attachés à préciser sa relation avec les différentes modifications post-traductionnelles des histones par des approches moléculaires d'immunoprécipitation de la chromatine.

Dans le troisième chapitre, nous avons voulu savoir si JMJ24 pouvait intervenir dans des voies de répression impliquant la méthylation de l'ADN et l'interférence par l'ARN. Pour cela nous avons réalisé des analyses du degré de méthylation de l'ADN suite à un traitement au bisulfite de sodium et étudié un quadruple mutant *jmj24dcl2dcl3dcl4* du point de vue phénotypique et de l'expression de gènes candidats potentiellement dérégulés. Si JMJ24 ne semble pas impliquée dans la méthylation ADN au niveau des gènes, nos résultats ont montré qu'elle était capable d'agir dans la même voie que les protéines DCL2, DCL3 et DCL4.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I. QUELLE EST LA FONCTION BIOLOGIQUE DE JMJ24 ?

Depuis le séquençage des génomes de nombreux organismes la fonction d'un gène peut être élucidé par l'utilisation d'approche de génétique inverse, c'est-à-dire de créer une mutation de perte de fonction dudit gène, et d'analyser le phénotype du mutant en résultant. Si ce type d'approche est réalisé efficacement chez la levure et la souris en remplaçant le gène sauvage par un allèle muté (par recombinaison homologue), cela n'est pas encore au point chez les plantes. Une alternative, efficace et largement utilisée chez *Arabidopsis*, est le criblage de collections de plantes mutagénisées avec un élément d'insertion mobile (transposons) ou stable (ADN-T) (Bouchez and Höfte, 1998). L'ADN-T est une séquence d'ADN, portée par un plasmide bactérien, qui est intégrée dans le génome nucléaire de la plante lors de la transformation par *Agrobacterium tumefaciens* (Gelvin, 2000). Des ADN-T sauvages ont été modifiés puis utilisés pour générer des banques de mutants d'insertion aléatoires, dont les collections Versailles, SALK et GABI. Il est possible d'identifier des mutants pour un gène d'intérêt par criblage *in silico* grâce au séquençage de l'ADN flanquant chacune des insertions de la collection. Dans l'équipe, une approche de génétique inverse a été choisie et des mutants pour *JMJ24* ont été recherchés dans les différentes collections de mutants d'insertion disponibles.

A. Caractérisation des mutants jmj24

1. Présentation des allèles

Pour tester la fonction du gène *JMJ24*, trois mutants d'insertion d'ADN-T ont été identifiés pour ce gène, et renommés *jmj24-1* (FLAG_497C01), *jmj24-2* (SALK_021260) et *jmj24-3* (GK-085C06). Ces différents mutants sont issus de trois collections différentes : Versailles, SALK et GABI, respectivement. La collection Versailles, de laquelle provient l'allèle *jmj24-1*, a été générée à partir de plantes sauvages de l'écotype Wassilewskija (Ws) et un ADN-T contenant le gène rapporteur *GUS* (codant la β-glucuronidase) ainsi que les gènes *NPTII* (codant la neomycine phosphotransferase II) et *BAR* (codant la phosphinothricine acétyl transférase), qui confèrent respectivement la résistance à la

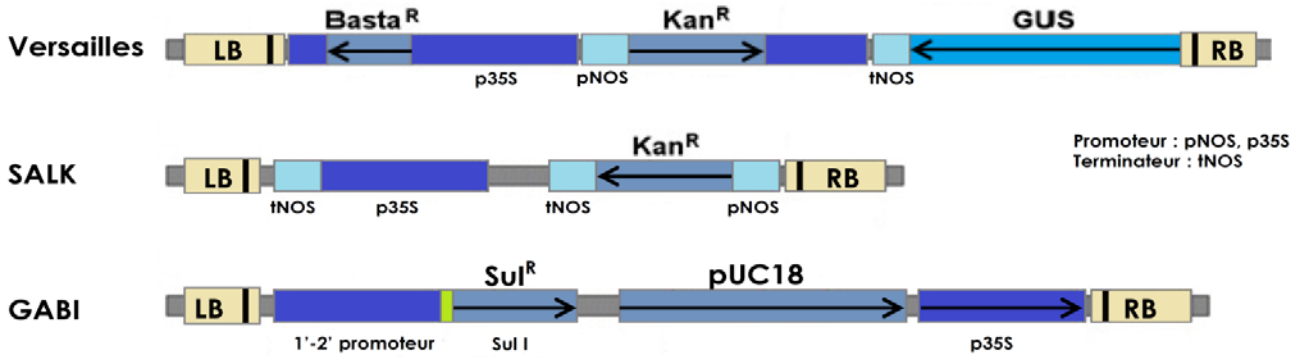


Figure 2.1 : ***Structure des ADN-T utilisés pour la génération des différentes collections de mutants d'insertion***. La partie entre les deux bordures de l'ADN-T (LB et RB) va s'insérer dans le génome de l'hôte. La sélection de plantes pour lesquelles un ou plusieurs évènements d'insertion se sont produits se fait par sélection avec l'antibiotique correspondant au(x) gène(s) de résistance porté par l'ADN-T. L'ADN-T utilisé possède les gènes de résistance à la kanamycine (Kan^R) et le basta ($Basta^R$) pour la collection Versailles (Bouchez *et al.*, 1993; Bechtold *et al.*, 1993), le gène de résistance à la kanamycine pour la collection SALK (Alonso *et al.*, 2003) et le gène de résistance à la sulfadiazine (Sul^R) pour la collection GABI (Rosso *et al.*, 2003). Les flèches noires indiquent l'orientation des gènes ou promoteur.

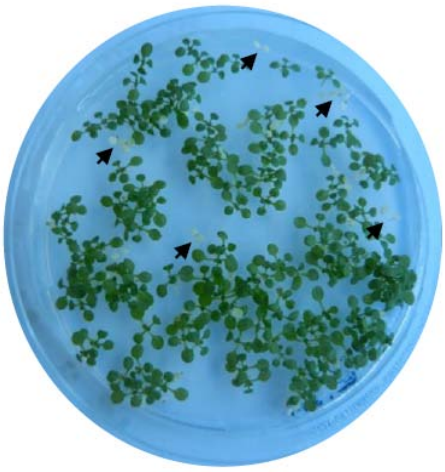


Figure 2.2 : ***Analyse du nombre de copies de l'ADN-T dans jmj24-1.*** Les graines ont été semées sur milieu MS supplémenté de kanamycine à 50 µg/ml. Les plantules sensibles (flèches noires) représentent un quart, tandis que les plantes résistantes représentent les trois quart de l'ensemble des plantules.

kanamycine et au BASTA (Bouchez *et al.*, 1993; Bechtold *et al.*, 1993) (**figure 2.1**). Les collections SALK et GABI, desquelles proviennent les allèles *jmj24-2* et *jmj24-3* respectivement, ont été générées à partir de plantes sauvages de l'écotype Columbia-0 (Col-0) et d'un ADN-T contenant le gène *NPTII* pour la collection SALK (Alonso *et al.*, 2003) et le gène *SUL1* (codant la dihydropteroate synthase et conférant la résistance à la sulfadiazine) pour la collection GABI (Rosso *et al.*, 2003). Pour l'allèle *jmj24-1*, l'insertion

s'est faite au niveau du premier intron contenu dans la région 5'UTR et dans les troisième et septième exons pour les allèles *jmj24-2* et *jmj24-3* respectivement (**figure 2.3**).

De plus, la collection de Versailles est composée de plantes transgéniques pouvant posséder plusieurs insertions de l'ADN-T. Pour écarter cette possibilité dans le cas des plantes *jmj24-1*, la présence d'une seule copie de l'ADN-T dans le mutant *jmj24-1* a été testée par l'analyse de la ségrégation de la résistance à la kanamycine, caractère lié à la présence de l'ADN-T, dans la génération F2 après croisement avec le sauvage Ws. Après semis sur milieu MS *in vitro* supplémenté en kanamycine, le nombre de plantules résistantes et de plantules sensibles a été quantifié (**figure 2.2**). Trois quart des plantules étaient résistantes contre un quart de sensibles, comme attendu dans le cas d'une ségrégation mendélienne monogénique. Ces résultats confirment donc la présence d'une seule copie de l'ADN-T dans *jmj24-1*. Cette analyse n'a pas pu être réalisable pour les allèles *jmj24-2* et *jmj24-3*, car dans l'écotype Col-0 le gène de résistance porté par l'ADN-T est rapidement réprimé et ne permet donc plus la sélection.

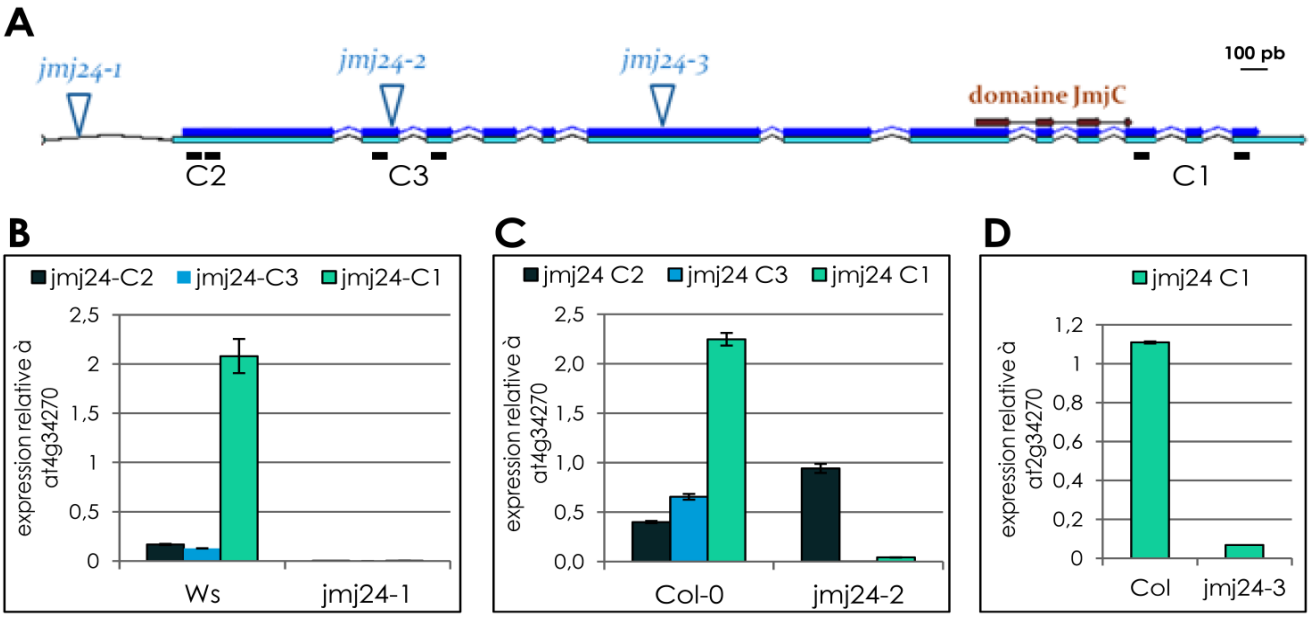


Figure 2.3 : ***Caractérisation des mutants d'insertion pour le gène JMJ24***. (**A**) JMJ24 est un gène de 4660 pb composé de 15 exons et 13 introns. Le premier intron (463pb) a la particularité de se trouver dans la région 5' UTR du gène. La séquence codante est indiquée en bleu foncé, la séquence génomique en turquoise et le domaine catalytique JmjC en marron. Le site présumé d'insertion de l'ADN-T est représenté par un triangle. Les traits noirs représentent les oligonucléotides utilisés en PCRq. (**B**) Les niveaux d'expression du gène *JMJ24* dans le sauvage Ws et le mutant d'insertion *jmj24-1* ont été obtenus à partir d'ARN extraits de plantules de 12j. (**C**) Les niveaux d'expression du gène *JMJ24* dans le sauvage Col-0 et le mutant d'insertion *jmj24-2* ont été obtenus à partir d'ARN extraits de plantules de 12j. (**D**) Les niveaux d'expression du gène *JMJ24* dans le sauvage Col-0 et le mutant d'insertion *jmj24-3* ont été obtenus à partir d'ARN extraits de plantules de 12j.

La détection de transcrits stables dans chacun des mutants a été réalisée par RT-qPCR (**figure 2.3**). Trois couples d'oligonucléotides ont été dessinés : un à proximité du site d'initiation de la transcription (C2), un au niveau du site d'insertion supposé de l'ADN-T dans *jmj24-2* (C3) et un en partie 3' de l'ARN (C1) (**figure 2.3a**). Les couples C1 et C3 ont été dessinés à cheval sur deux exons afin de permettre l'identification de contaminations par de l'ADNg. Pour chacun des couples, aucune expression de *JMJ24* n'a pu être détectée sur des plantules de 12 jours pour *jmj24-1*, qui est donc un mutant nul (**figure 2.3b**). Pour *jmj24-2* et *jmj24-3*, des transcrits ont pu être détectés avec les couples C1 et C2 et voire même une augmentation du niveau de ces transcrits avec les amorces C2 (**figure 2.3c-d**). Cette augmentation peut être due à une activité parasite d'un des promoteurs 35S porté par l'ADN-T. Les oligonucléotides C1 utilisés pour la RT-qPCR se trouvant en aval du domaine JmjC, ces deux allèles sont capables de produire soit des transcrits tronqués possédant ce domaine JmjC, soit plus probablement des transcrits aberrants ayant très peu de chance d'être dans le bon cadre de lecture.

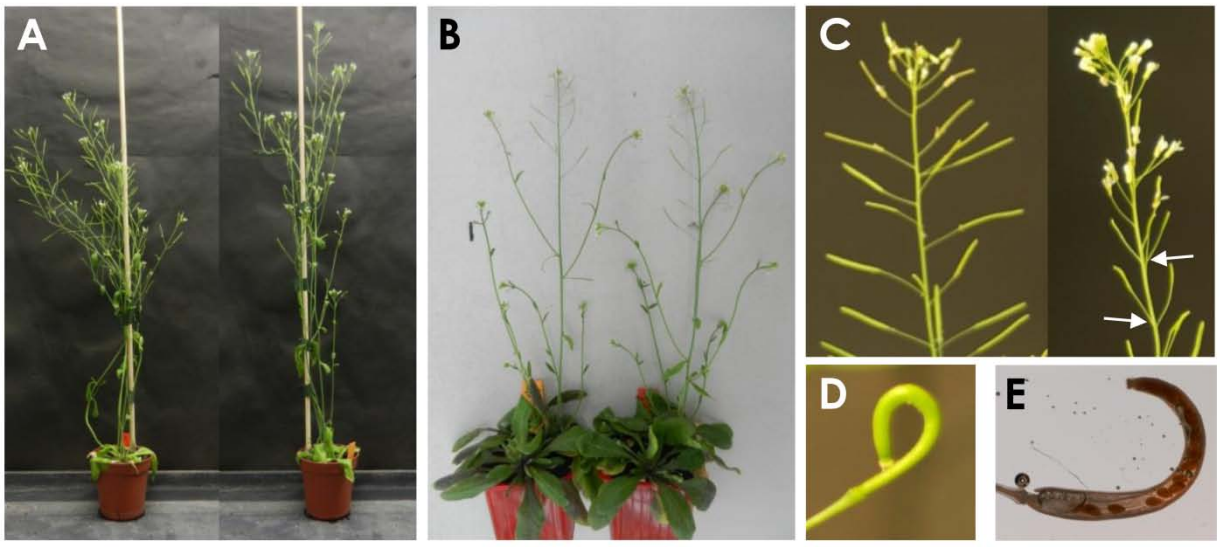


Figure 2.4 : ***Phénotype de la plante entière***. (**A**) Les plantes mutantes *jmj24-1* (droite) sont plus grandes que les plantes sauvages Ws (gauche). (**B**) Les plantes mutantes *jmj24-2* (droite) ne présentent pas de différence par rapport aux plantes sauvages Col-0 (gauche). (**C**) Répartition irrégulière des siliques le long de la tige principale dans le mutant *jmj24-1* (droite), indiquée par les flèches, par rapport au sauvage (gauche). (**D**) Silique courbée dans le mutant *jmj24-1*. (**E**) Silique courbée dans le mutant *jmj24-1* éclaircie au chloralhydrate.

2. Etude phénotypique des mutants *jmj24*

2.1. Description de la plante entière

Après floraison, les plantes *jmj24-1* sont plus grandes que les plantes sauvages de référence Ws (**figure 2.4a**), tandis que les plantes *jmj24-2* ne présentent pas de différence de taille par rapport au sauvage Col-0 (**figure 2.4b**). Il a déjà été reporté qu'une augmentation de la taille globale d'une plante pouvait être liée à une polyploïdisation - augmentation du nombre de copies de chaque chromosome (Woodfield *et al.*, 2006). La ploïdie des mutants *jmj24-1* a donc été analysée. La quantité d'ADN présent dans des noyaux isolés à partir de feuille de rosette d'*Arabidopsis*, et mis en contact avec un marqueur fluorescent, a été mesurée par cytométrie en flux à l'INRA de Versailles (**figure 2.5**). Un système modèle, ici la tomate, pour lequel la quantité relative d'ADN par noyau est connue et stable, a été utilisé comme contrôle. Par cette technique nous avons accès à la fluorescence émise par chaque noyau et donc à son contenu chromosomique. Pour l'écotype sauvage Ws et le mutant *jmj24-1*, quatre pics d'intensité de fluorescence ont pu être dénombrés correspondant à des noyaux possédant deux, quatre (correspondant à la phase S-M du cycle cellulaire), huit ou seize copies (endoréplication, (Traas *et al.*, 1998)) de chaque jeu de chromosomes. De plus, la répartition de l'intensité de fluorescence parmi la population de noyaux analysés entre

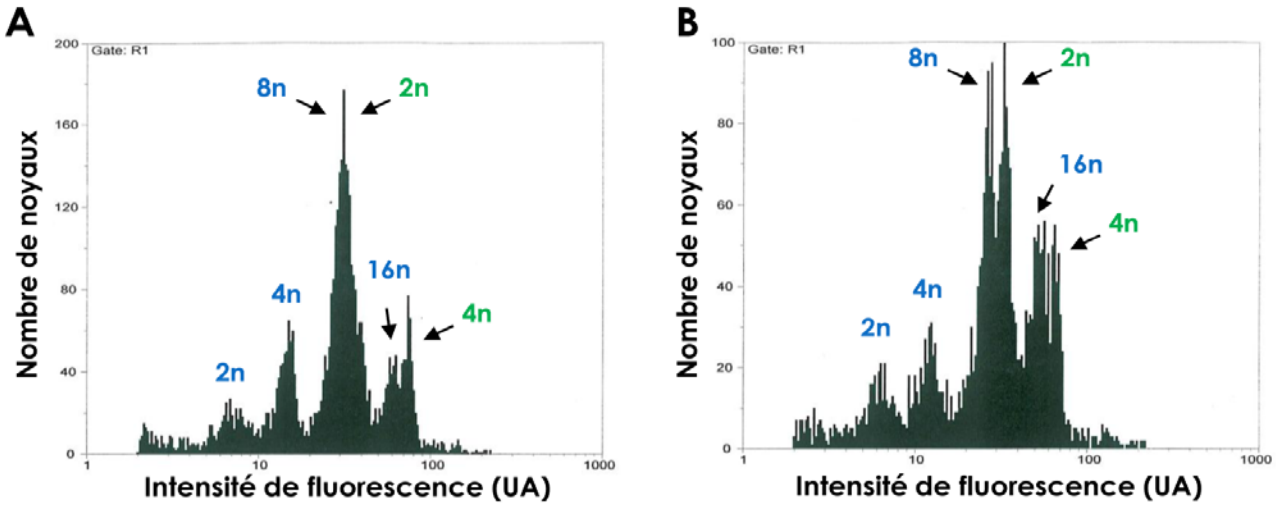


Figure 2.5 : ***Analyse de la ploïdie par cytométrie en flux***. (**A**) Histogramme du contenu en ADN de feuilles de rosette de plantes sauvages Ws comparé à celui de feuilles de tomate (témoin). (**B**) Histogramme du contenu en ADN de feuilles de rosette de plantes mutantes *jmj24-1* comparé à celui de feuilles de tomate.
Les chiffres en bleu correspondent à *Arabidopsis* et ceux en vert à la tomate.

sauvage et mutant n'est pas modifiée. Le mutant *jmj24-1* ne présente donc pas d'augmentation de la ploïdie et l'augmentation de taille observée n'est donc pas associée à ce paramètre.

La distribution des siliques le long de la hampe des mutants *jmj24-1*, mais pas *jmj24-2* ni *jmj24-3*, est irrégulière, avec la présence de plusieurs siliques par nœud et des entre-nœuds plus courts (**figure 2.4c**). L'absence d'expression du gène *JMJ24* pourrait donc entrainer la dérégulation des signaux de positionnement contrôlant l'espacement ou/et le timing d'initiation des primordia floraux. Les siliques sont aussi généralement plus courtes et parfois courbées (**figure 2.4d**), traduisant l'avortement ou l'arrêt de croissance de certains embryons (**figure 2.4e**).

L'impact de la mutation de *JMJ24* sur la transition florale en JL a aussi été étudié (**figure 2.6**). Le nombre de feuilles de rosette total avant l'apparition de la hampe primaire a été compté. Avec une moyenne de 6,2 feuilles pour *jmj24-1* contre 6,45 pour Ws et 9,96 et 10 pour *jmj24-2* et *jmj24-3* respectivement contre 10,24 pour Col-0, aucune différence entre mutant et sauvage, quelque soit l'allèle, n'a pu être constatée. JMJ24 ne semble pas intervenir dans le timing de l'induction florale dans des conditions de jours longs.

2.2. Description des phénotypes aux stades précoces

Afin de savoir si les mutants *jmj24-1* étaient aussi affectés dans les stades précoces de développement, les mesures de la taille des graines, ainsi que des cinétiques sur plusieurs jours permettant de suivre de la taille des cotylédons et de la longueur des racines de plantules ont été réalisées en JL comme en jours courts (JC, photopériode de 8h). En JL, la taille des cotylédons est augmentée chez le mutant *jmj 24-1*, avec une aire moyenne de 2,73 (± 0,06) mm² à 6 jours contre 2,27 (± 0,07) mm² chez le sauvage Ws (**figure 2.7a**). De même une augmentation de la taille des racines a pu être constatée avec une longueur moyenne de 16,06 (± 0,26) mm à 6 jours chez le mutant contre 12,16 (± 0,32) mm chez le sauvage (**figure 2.7b**). En JC, une augmentation de la taille des cotylédons et de la longueur des racines a aussi été observée, avec une aire moyenne de 2,05 (± 0,08) mm² pour le mutant *jmj24-1* contre 1,65 (± 0,06) mm² pour le sauvage (**figure 2.7a**) et une longueur racinaire moyenne de 17,21 (± 0,29) mm pour *jmj24-1* contre 13,19 (± 0,33) mm pour Ws, respectivement (**figure 2.7b**). Le poids d'une graine étant dépendant de sa taille, la pesée de cent graines de chaque génotype a été effectuée. Les graines du mutant *jmj24-1* sont plus grosses avec un poids moyen pour cent graines de 2,7 mg au lieu de 1,9 mg chez le sauvage.

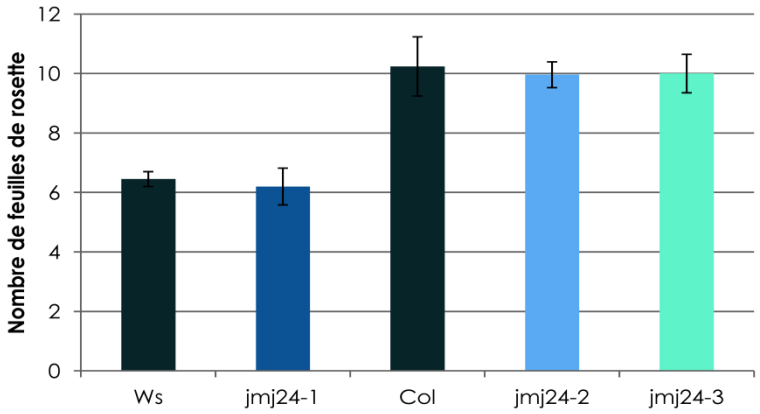


Figure 2.6 : ***Impact de JMJ24 sur la floraison***. Temps de floraison des lignées mutantes et sauvages cultivées en JL. Le nombre total de feuilles de rosette formées jusqu'à la transition florale a été compté (n = 24-25 pour chaque génotype). Les barres d'erreur indiquent l'écart-type.

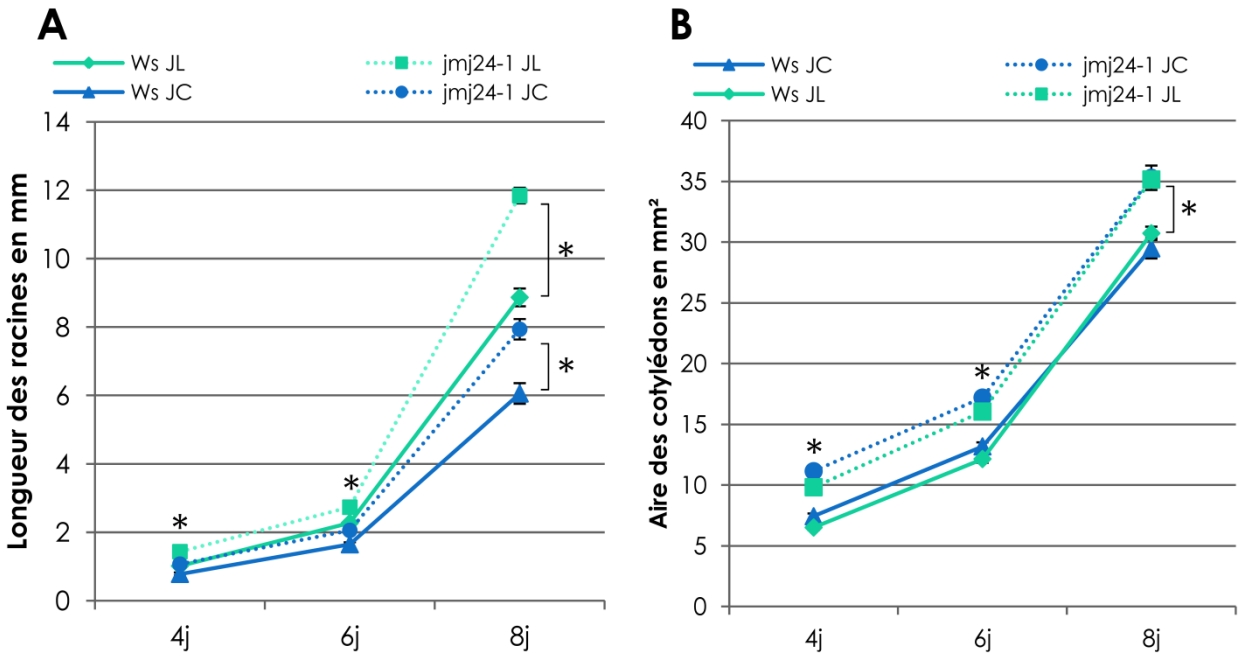


Figure 2.7 : ***Étude des phénotypes aux stades précoces***. (**A**) Longueur des racines chez le sauvage et le mutant *jmj24-1* en JL et JC (n=32-38). (**B**) Aire des cotylédons chez le sauvage et le mutant *jmj24-1* en JL et JC (n=12-35).
Les données représentent la valeur moyenne ± l'erreur standard (SD). * P < 0,01 calculée grâce au test *t* de Student pour le mutant par rapport au sauvage.

2.3. Description du phénotype floral

Le simple mutant *jmj24-1* est affecté au niveau du développement de la fleur avec la présence de fleurs à cinq pétales (**figure 2.8a**). La présence de ces fleurs à cinq pétales a pu être constatée sur 100 % des plantes mutées observées. L'analyse plus poussée du nombre d'organes floraux a permis de mettre en évidence une augmentation, non seulement du nombre de pétales, mais aussi du nombre de sépales et carpelles, alors que le nombre d'étamines ne semble pas impacté (**figure 2.8b**). En moyenne, les fleurs du mutant *jmj24-1* possèdent 4,99 (± 0,03) sépales, 4,99 (± 0,04) pétales, 5,06 (± 0,08) étamines et 2,48 (± 0,05) carpelles, contre 4,04 (± 0,02) sépales, 4,02 (± 0,01) pétales, 5,45 (± 0,06) étamines et 2 carpelles pour le sauvage de référence Ws. De plus, 18,49 % des organes floraux du mutant *jmj24-1* présentent des anomalies de développement, pour seulement 7,36 % chez la plante sauvage, avec un fort biais au niveau des étamines qui sont touchées dans 76,5 % des cas (**figure 2.9**).

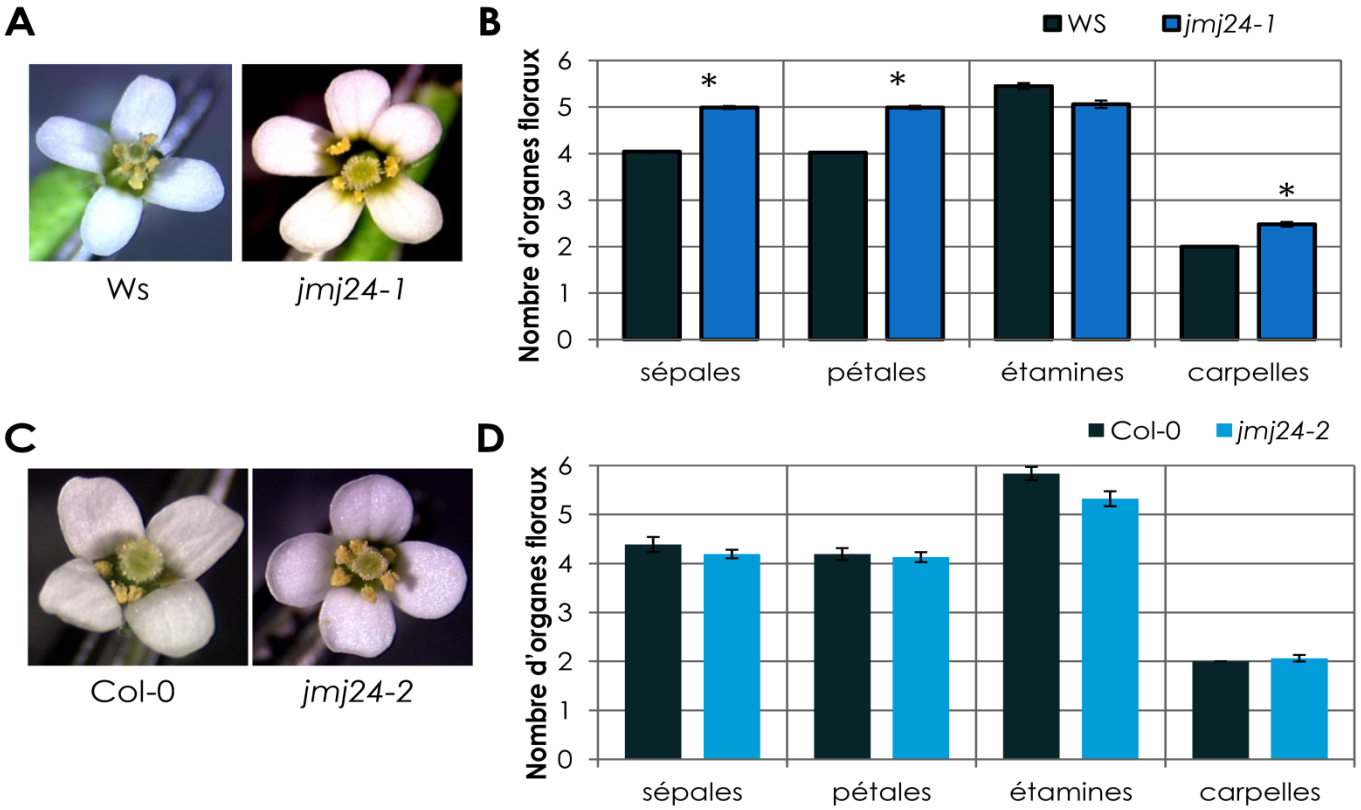


Figure 2.8 : ***Phénotype floral des mutants jmj24***. (**A**) Les fleurs du mutant *jmj24-1* présentent des pétales surnuméraires comparées au sauvage de référence. (**B**) Nombre d'organes floraux par fleur chez le sauvage Ws et le mutant *jmj24-1*. (n=100). (**C**) Fleurs du mutant *jmj24-2* et du sauvage Col-0. (**D**) Nombre d'organes floraux par fleur chez le sauvage et le mutant *jmj24-2*. (n=30).
Les données représentent la valeur moyenne ± l'erreur standard (SD). *P < 0,01, calculée grâce au test *t* de Student.

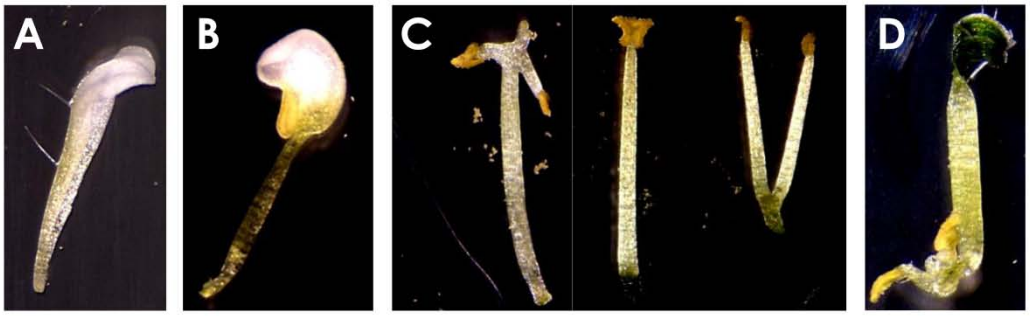


Figure 2.9 : ***Organes floraux aberrants dans le mutant jmj24-1***. (**A**) Organe intermédiaire entre sépale et pétale. (**B**) Organe intermédiaire entre pétale et étamine. (**C**) Étamines avec plusieurs anthères. (**D**) Organe intermédiaire entre sépale et étamine.

L'analyse du phénotype floral a aussi été réalisée pour l'allèle *jmj24-2* (**figure 2.8c-d**). Les plantes mutées possèdent en moyenne 4,19 (± 0,09) sépales, 4,13 (± 0,10) pétales, 5,32 (± 0,15) étamines et 2,06 (± 0,07) carpelles, contre 4,39 (± 0,15) sépales, 4,19 (± 0,12) pétales, 5,84 (± 0,13) étamines et 2 carpelles pour les plantes sauvages Col-0. À l'inverse de *jmj24-1*, le mutant *jmj24-2* ne présente donc pas d'augmentation du nombre de ses organes floraux. Il est intéressant de noter que si, dans les sauvages, des variations du nombre de sépales, pétales ou étamines existent, le nombre de carpelles est quant à lui invariable. De plus, alors qu'il est admis qu'*Arabidopsis thaliana* possède six étamines (Smyth *et al.*, 1990), il existe cependant des différences entre écotypes. En effet, pour l'écotype Ws la majorité des fleurs n'en possède que quatre ou cinq (**figure 2.10a**), tandis que pour l'écotype Col-0, les fleurs sont majoritairement à six étamines (**figure 2.10b**).

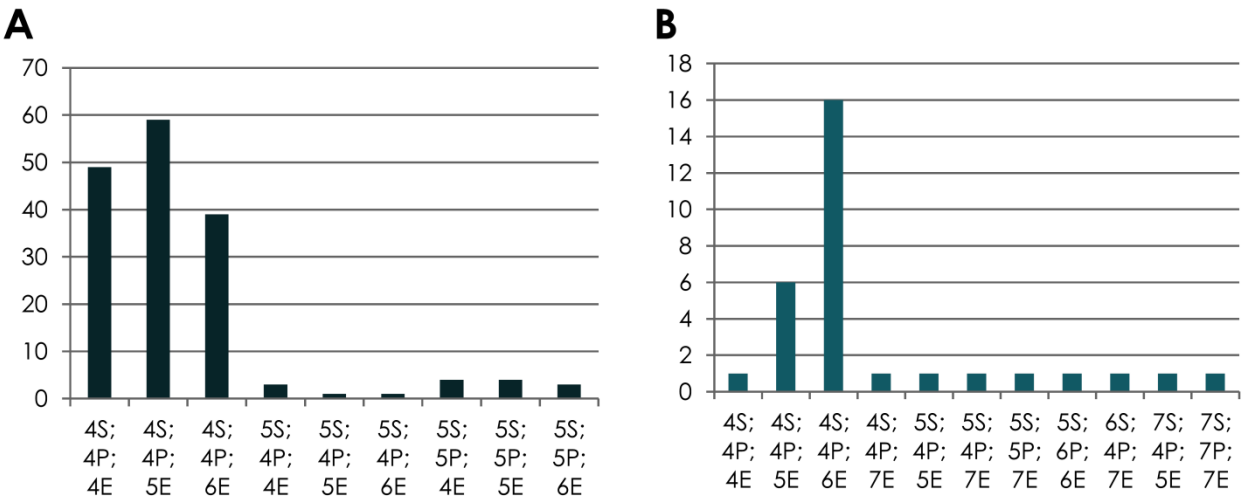


Figure 2.10 : ***Organisation des fleurs selon les écotypes***. (**A**) Répartition des fleurs du sauvage Ws en fonction du diagramme floral sépales (S), pétales (P) et étamines (E). (n=163) (**B**) Répartition des fleurs du sauvage Col-0 en fonction du diagramme floral. (n = 30).
Le nombre de carpelles n'a pas été considéré dans cette étude.

L'observation de ces fleurs a aussi permis de constater que celles-ci sont plus grandes dans le mutant *jmj24-1* par rapport au sauvage de référence Ws (**figure 2.11a**), tandis qu'il n'existe pas de différence de taille pour les mutants *jmj24-2* et *jmj24-3* par rapport au sauvage de référence Col-0 (**figure 2.11b**). L'augmentation de taille des fleurs du mutant *jmj24-1* corrèle avec une augmentation de la taille de chacun des organes floraux (**figure 2.11c,e,g,i**). Pour les mutants *jmj24-2* et *jmj24-3*, tous les organes floraux sont de même taille que ceux du sauvage Col-0 (**figure 2.11d,f,h,j**). Il est toutefois à noter

Figure 2.11 : ***Taille des organes floraux***. (**A**) Fleurs au stade 15 du mutant *jmj24-1* (droite) et du WT de référence (gauche) (Smyth *et al.*, 1990). (**B**) Fleurs au stade 15 des mutants *jmj24-2* (droite) et *jmj24-3* (milieu) et du WT de référence (gauche). (**C**) Sépales du mutant *jmj24-1* (droite) et du WT de référence (gauche). (**D**) Sépales des mutants *jmj24-2* (droite) et *jmj24-3* (milieu) et du WT de référence (gauche). (**E**) Pétales du mutant *jmj24-1* (droite) et du WT de référence (gauche). (**F**) Pétales des mutants *jmj24-2* (droite) et *jmj24-3* (milieu) et du WT de référence (gauche). (**G**) Étamines du mutant *jmj24-1* (droite) et du WT (gauche). (**H**) Étamines des mutants *jmj24-2* (droite) et *jmj24-3* (milieu) et du WT (gauche). (**I**) Carpelles du mutant *jmj24-1* (droite) et du WT (gauche). (**J**) Carpelles des mutants *jmj24-2* (droite) et *jmj24-3* (milieu) et du WT (gauche).

que les trois mutants possèdent une caractéristique commune : la présence de trichomes sur les sépales qui n'existent dans les plantes sauvages.

Lors de l'analyse de la ségrégation du gène de résistance à la kanamycine, conduite afin d'écarter la possibilité d'une présence de plusieurs copies de l'ADN-T dans le mutant *jmj24-1*, il a été observé dans la F1 que le phénotype floral, à savoir la présence de fleurs à cinq pétales, disparaissait. L'allèle *jmj24-1* est donc un allèle récessif. De ce fait, est attendu en F2 après auto-fécondation, dans le cas d'une ségrégation mendélienne monogénique, une proportion de 75 % de plantes possédant des fleurs à quatre pétales, et de 25 % de plantes possédant des fleurs à cinq pétales. Or la distribution obtenue à partir des 277 plantes étudiées est de 81,9 % des plantes présentant des fleurs à quatre pétales contre 18,1 % de plantes présentant des fleurs à cinq pétales (**figure 2.12**), ce qui est statistiquement différent des proportions attendues. De plus, parmi les plantes possédant le phénotype floral, certaines ne présentent pas la mutation (12 %) et inversement, parmi les plantes portant la mutation, certaines ne présentent pas le phénotype floral (15 %). Ce résultat permet d'émettre deux hypothèses : soit malgré l'absence d'expression de *JMJ24* dans le mutant, l'ADN-T est inséré dans un autre gène qui est responsable du phénotype, soit *JMJ24* est impliqué dans le contrôle d'information épigénétique donc une transmission qui ne suit pas les lois de la ségrégation mendélienne. Pour montrer que *JMJ24* est bien responsable de ces phénotypes des expériences de complémentation fonctionnelle ont été conduites.

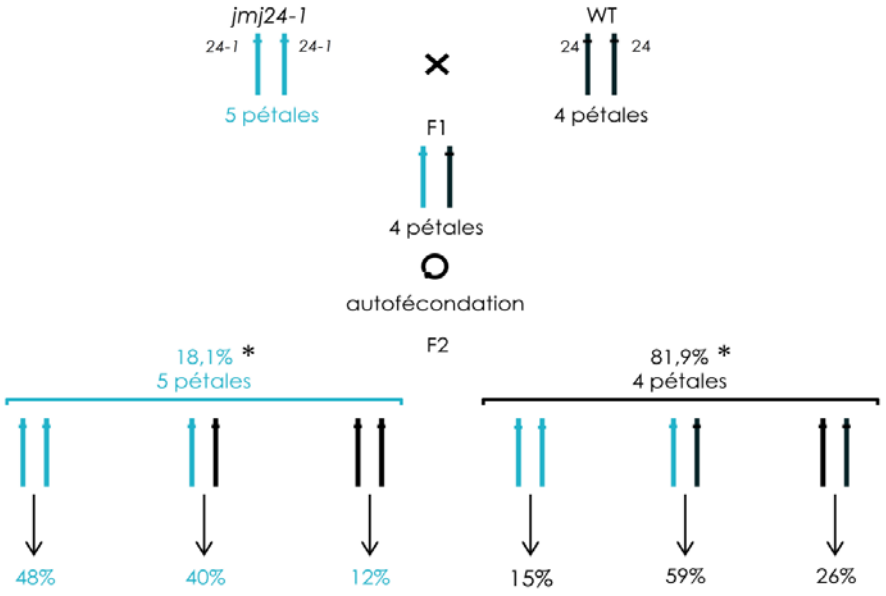


Figure 2.12 : ***Analyse de ségrégation du phénotype floral***. La répartition en F2 du phénotype floral ne suit pas une distribution de type mendélien. Certaines plantes présentent le phénotype alors qu'elles n'arborent pas la mutation. (n = 277)
* Différence statistique entre la valeur théorique et la valeur observée calculée grâce au test du khi² avec a = 0,01 pour 1 ddl.

3. Analyses de la complémentation fonctionnelle des mutants *jmj24*

Afin de valider que la mutation de *JMJ24* est bien responsable des phénotypes observés, la complémentation fonctionnelle (CF) de ceux-ci a été réalisée. La construction employée pour complémenter les mutants *jmj24-1* et *jmj24-2* comprend le promoteur endogène de *JMJ24*, à savoir les 1970 pb en amont du 5'UTR, fusionné à la région 5'UTR contenant le premier intron (**cf I.C**), et l'ADNc de *JMJ24*. Une étiquette Flag-HA a été ajoutée au niveau de l'extrémité 3' de l'ADNc (**figure 2.13**). La résistance portée par l'ADN-T a été choisie en fonction des fonds génétiques de destination. Ici, nous avons choisi le vecteur pFA1300 porteur du gène de résistance à l'hygromycine (**figure 2.1 et figure 2.13**). La longueur des racines, ainsi que la présence de fleurs à cinq pétales ont été analysées dans l'optique d'évaluer l'efficacité de la complémentation. Deux lignées de complémentation monoinsertionnelles pour le gène de résistance porté par l'ADN-T ont été étudiées : *jmj24-1*CF13 et *jmj24-1*CF25. L'analyse de la longueur des racines a montré une restauration du phénotype sauvage avec une longueur moyenne à 5j en JL de 6,45 ± 0,28 mm pour la lignée *jmj24-1*CF13 et de 6,31 ± 0,37 mm pour la lignée *jmj24-1*CF25 contre 8,13 ± 0,38 mm pour le mutant *jmj24-1* et 5,80 ± 0,36 pour le sauvage Ws (**figure 2.14a**). Cette restauration a été également constatée en JC. (**figure 2.14b**).

La restauration du phénotype racinaire dans les deux lignées distinctes de complémentation fonctionnelle indique que les phénotypes observés précédemment à des stades précoces dans le mutant *jmj24-1* sont donc bien dus à la mutation du gène. *JMJ24* est donc impliqué dans des processus développementaux contrôlant la taille des organes de la plante, aussi bien aériens que souterrain. Cependant au niveau de l'appareil reproducteur, la restauration du phénotype floral n'a été observée qu'en T1 et

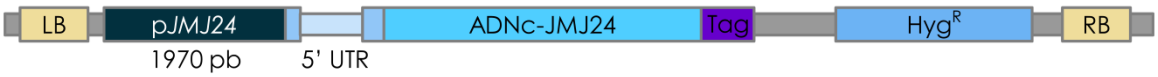


Figure 2.13 : ***Structure de l'ADN-T utilisé pour la génération des lignées de complémentation***. La construction utilisée pour complémenter les mutants est composée du promoteur endogène putatif (p*JMJ24*), de la région 5'UTR et de l'ADNc de *JMJ24*, fusionné à une étiquette Flag-HA (Tag). L'ADN-T utilisé possède le gène de résistance à l'hygromycine (Hyg^R). Schéma non à l'échelle.

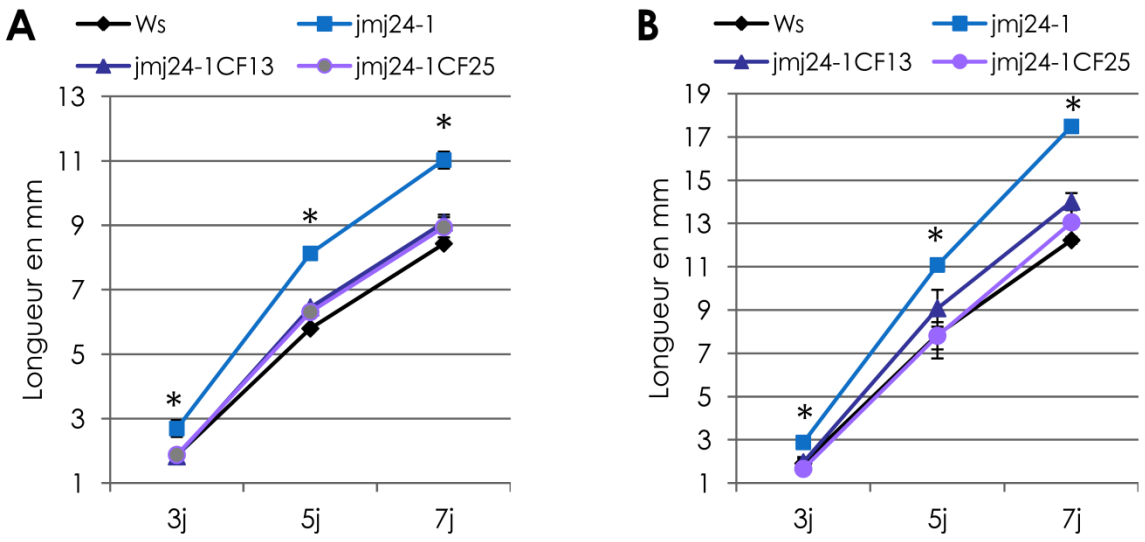


Figure 2.14 : ***Étude des lignées de complémentation***. Longueur des racines chez le sauvage, le mutant *jmj24-1*, la lignée C13 et la lignée C25 en JL (**A**) et JC (**B**) (n = 18
Les données représentent la valeur moyenne ± l'erreur standard (SD) de deux répétitions biologiques. * P < 0,01 calculée grâce au test *t* de Student.

T2 après transformation. En T3, les plantes transformées présentent à nouveaux des fleurs à cinq pétales. Ce retour en T3 du phénotype floral peut s'expliquer par un manque de certaines séquences régulatrices non contenues dans le promoteur ou dans le premier intron, permettant l'expression correcte de *JMJ24* dans l'appareil reproducteur.

B. Étude des lignées d'introgressions jmj24-1C et jmj24-2W

Au vu de la disparité phénotypique entre les allèles *jmj24-1*, *jmj24-2* et *jmj24-3*, il est légitime de se demander si cette différence est due : (1) au fait que ces trois mutations sont présentes dans des écotypes différents, ou (2) au fait que *jmj24-1* soit un allèle nul alors que *jmj24-2* et *jmj24-3* sont des mutants dans lesquels l'expression de *JMJ24* est simplement fortement diminuée (**figure 2.3**).

Afin de répondre à cette problématique, des introgressions de chacun des allèles dans l'autre écotype ont été conduites. Pour cela, plusieurs croisements successifs entre *jmj24-2* et Ws ont été effectués, de même qu'entre *jmj24-1* et Col-0 (**figure 2.15a**). Les plantes F2 homozygotes pour *jmj24-2* ont été rétrocroisées avec Ws et la descendance génotypée afin de sélectionner l'allèle *jmj24-2* et des marqueurs microsatellites spécifiques à Ws. Après un troisième rétrocroisement avec Ws, des plantes, nommées *jmj24-2W*, seront sélectionnées en F2 avec la mutation *jmj24-2* et les marqueurs

seulement spécifiques à Ws. Les marqueurs microsatellites utilisés ici ont été choisis en fonction de leur position sur les chromosomes, à savoir un sur chaque bras chromosomique et de préférence aux extrémités de ceux-ci (**figure 2.15b**). Vu que chez *Arabidopsis* la recombinaison apparaît à une fréquence assez faible, et que son intensité est variable à l'échelle du chromosome où elle augmente graduellement avec la distance au centromère (Singer *et al.*, 2006; Giraut *et al.*, 2011), le choix de marqueurs SSLP aux extrémités des bras permet d'augmenter la probabilité d'observer un « crossing over » et donc d'un enrichissement en fond génétique d'intérêt. Cette sélection assistée par marqueurs permet donc, grâce à un génotypage, de se limiter à trois croisements au lieu des six préconisés. Le même protocole a été appliqué au mutant *jmj24-1*, et les plantes ainsi obtenues ont été nommées *jmj24-1C*. L'analyse phénotypique du mutant *jmj24-1C* est actuellement en cours au laboratoire.

C. Expression tissulaire de JMJ24

Afin d'étudier l'expression tissulaire de *JMJ24*, deux lignées de fusion transcriptionnelle du promoteur endogène avec le gène rapporteur GUS ont été construites (**figure 2.16**). Pour la première construction, nommée proJMJ24:GUS, seul le

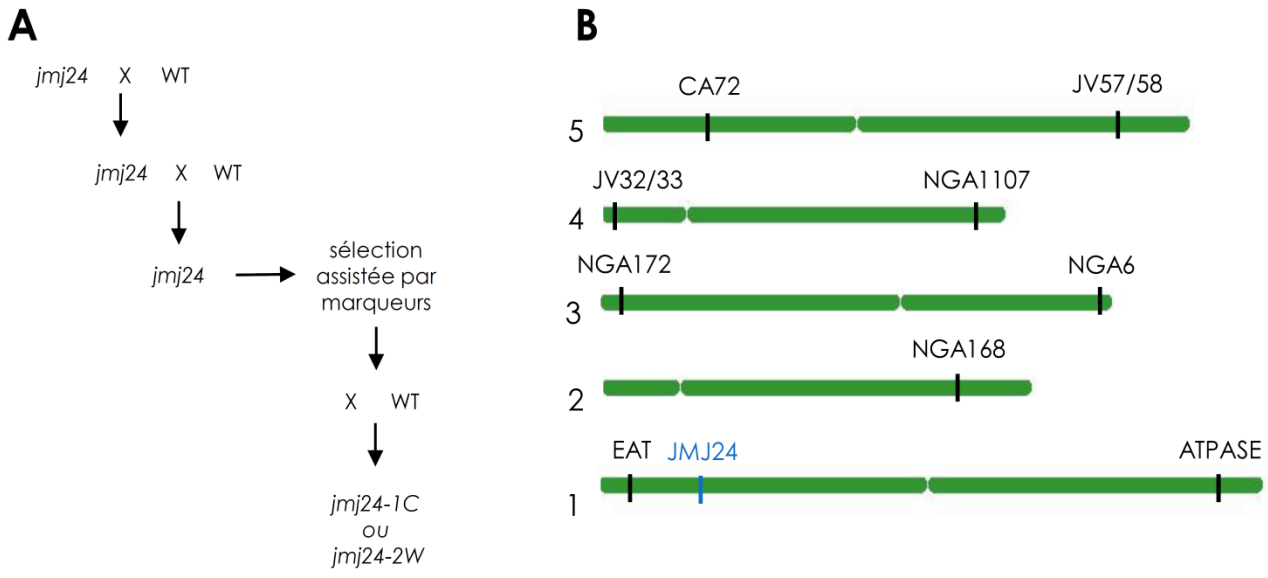


Figure 2.15 : ***Stratégie d'introgression***. (**A**) Trois rétrocroisements successifs ont été réalisés, avec sélection de mutant *jmj24* possédant le plus de marqueur de l'écotype d'intérêt après le deuxième croisement. (**B**) Position relative des différents marqueurs utilisés sur chacun des cinq chromosomes d'*Arabidopsis*. Représentation non à l'échelle.

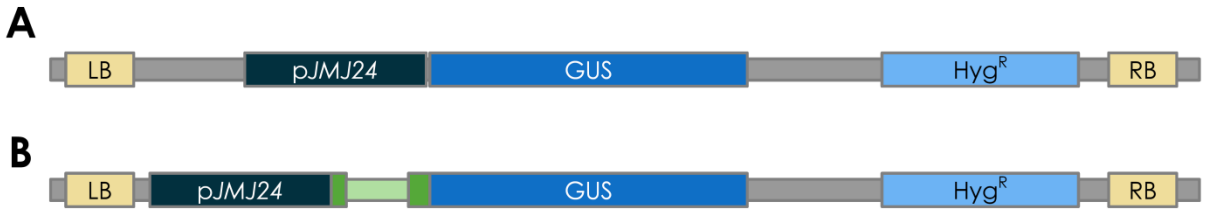


Figure 2.16 : ***Structure des ADN-T utilisés pour la génération des lignées rapportrices GUS***. Deux fusions transcriptionnelle ont été construites. (**A**) La première est composée du promoteur endogène putatif (p*JMJ24*) fusionné au gène rapporteur GUS. L'ADN-T utilisé possède le gène de résistance à l'hygromycine (Hyg^R). (**B**) La seconde est composée du promoteur endogène putatif (p*JMJ24*), plus la région 5'UTR (vert : exon, vert clair : intron), fusionné au gène rapporteur GUS. L'ADN-T utilisé possède le gène de résistance à l'hygromycine (Hyg^R).

promoteur endogène a été utilisé, tandis que pour la deuxième construction, nommée proJMJ24:intron1:GUS, la séquence de la région 5'UTR a été ajoutée en plus du promoteur endogène. En effet, pour le mutant *jmj24-1* l'insertion de l'ADN-T dans le premier intron contenu dans cette région est associée à une abolition complète de l'expression du gène, suggérant un rôle potentiel de cette séquence dans la régulation de l'expression de *JMJ24* (**figure 2.3**). En effet, la présence de séquences régulatrices dans le premier intron d'un gène a déjà été observée chez plusieurs espèces : eukaryotic initiation factor (eIF) 2 alpha chez l'humain (Silverman *et al.*, 1992), apolipoproteinAI (apoAI) chez le poulet (Bhattacharyya and Banerjee, 1999) ainsi que RHD3 et AGL13 chez *Arabidopsis thaliana* (Wang *et al.*, 2002; Schauer *et al.*, 2009). Dans le but de voir s'il existe une différence d'activité du promoteur de *JMJ24* entre les deux écotypes, des plantes sauvages Ws et Col-0 ont été transformées.

Pour la construction pro*JMJ24*:*GUS*, l'analyse tout au long du développement de la plante, du stade plantule aux fleurs, révèle un patron d'expression de *JMJ24* similaire pour les deux écotypes, avec une présence de la coloration bleue dans les cellules du système vasculaire (**figure 2.17a-g et j,-l**), ainsi que dans les ovules de jeunes fleurs (**figure 2.17k**), mais qui disparait à des stades plus tardifs du développement de la fleur (**figure 2.17l**) et les cellules de la coiffe dans les premiers jours post-germination (**figure 2.17i**). Le promoteur *JMJ24* est donc actif dans le système vasculaire et plus précisément au niveau du phloème (**figure 2.17g et j**). En effet, la discontinuité de la coloration des faisceaux vasculaires, observée notamment au niveau des racines (**figure 2.17h**), est caractéristique du phloème en différenciation (Bauby *et al.*, 2007). De

plus, la coloration des pôles de phloème primaire, révélée en coupe transversale de hampe, confirme cette première observation (**figure 2.17j**).

La construction avec le premier intron, pro*JMJ24*:intron1:*GUS*, présente un patron d'expression de *JMJ24* similaire à celui observé pour la construction pro*JMJ24*:*GUS*, avec une présence de la coloration dans les cellules du système vasculaire de la plantule à la fleur (**figure 2.18**) et les cellules de la coiffe dans les premiers jours post-germination (**figure 2.18g**). De nouveau, le tissu dans lequel le promoteur est actif est le phloème, comme en attestent la présence de coloration bleue au niveau des pôles de phloème primaires en coupe transversale de hampe (**figure 2.18h-i**) et l'agencement dans la racine en deux faisceaux parallèles encadrant le xylème (**figure 2.18f**). Cependant la présence du premier intron a pour conséquence une extension du territoire d'expression

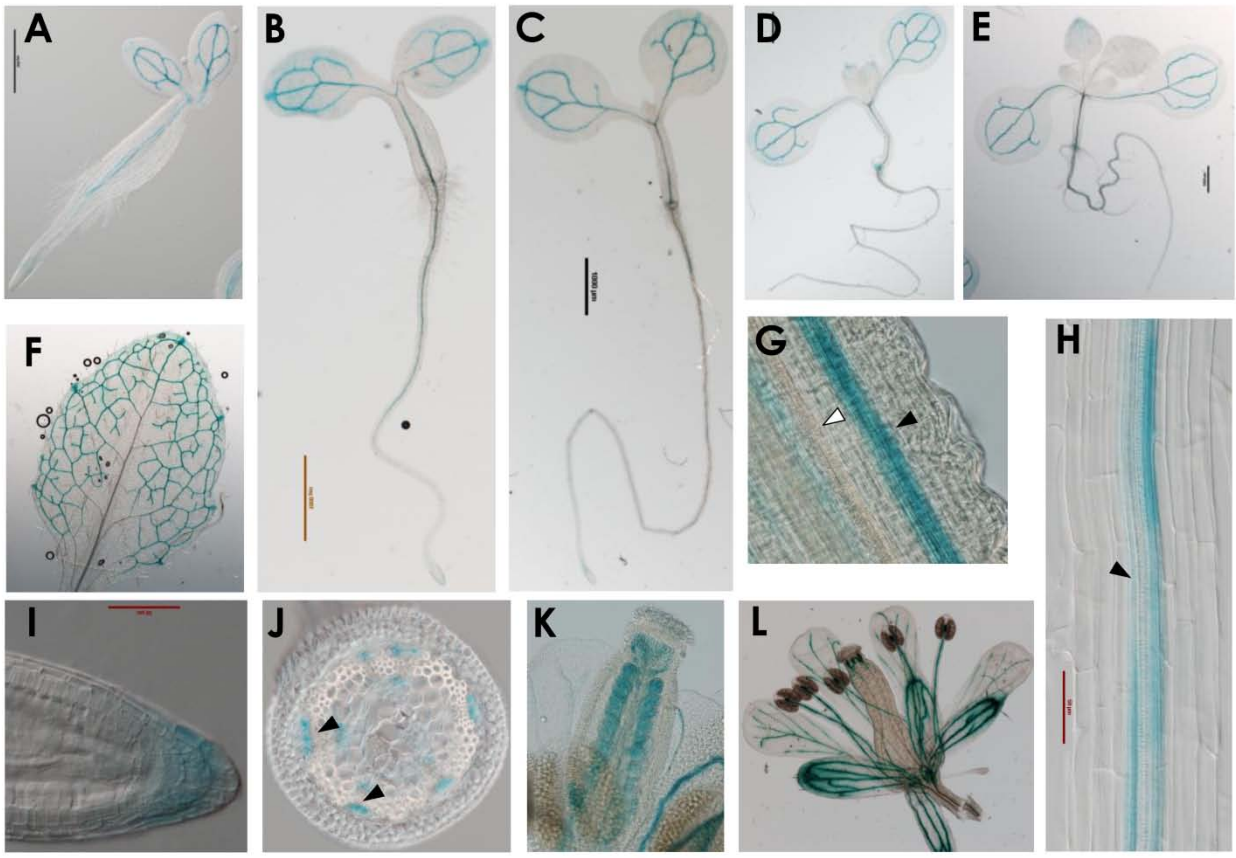


Figure 2.17 : ***Le promoteur JMJ24 (proJMJ24:GUS) est actif dans phloème***. (**A**) Plantules de 2 j. (**B**) Plantules de 4 j. (**C**) Plantules de 6 j. (**D**) Plantules de 8 j. (**E**) Plantules de 10 j. (**F**) Feuille de rosette. (**G**) Racine primaire de plantule de 4 j. La flèche noire indique le phloème et la flèche blanche, le xylème. (**H**) Racine primaire de plantule de 6 j. La flèche noire indique une discontinuité du phloème (**I**) Pointe racinaire de racine primaire de plantule de 4 j. (**J**) Coupe transversale de hampe florale primaire. Les flèches pointent les différents pôles de phloème primaire. (**K**) Fleur de stade 11 (Smyth *et al.*, 1990). (**L**) Fleur de stade 15.

de *JMJ24* aux cellules initiales de la racine (**figure 2.18g**), aux cellules du cortex de la hampe (**figure 2.18h**), aux grains de pollen (**figure 2.18k**). L'expression du gène *JMJ24* dans le système vasculaire dès les stades précoces du développement jusqu'aux organes floraux semble indiquer une fonction du gène associée au développement et/ou au fonctionnement des faisceaux conducteurs. De plus, une activité du promoteur et donc la présence de transcrits, au niveau du phloème est cohérente avec les phénotypes pléiotropes observés pour *jmj24-1*. Néanmoins, la localisation cellulaire de la protéine sera nécessaire pour savoir si celle-ci est également localisée dans le phloème ou si elle est présente dans les cellules adjacentes.

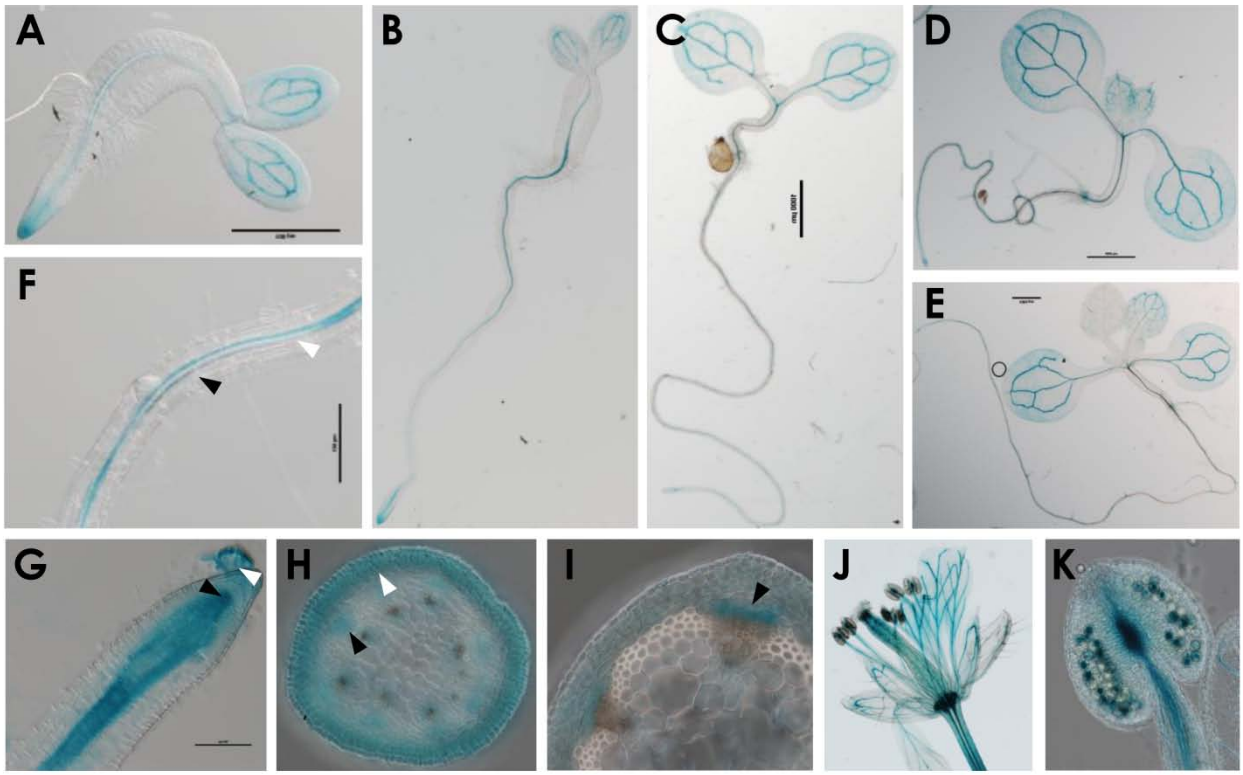


Figure 2.18 : ***La présence du premier intron (proJMJ24:intron1:GUS) étend le territoire d'expression du promoteur JMJ24***. (**A**) Plantules de 2 j. (**B**) Plantules de 4 j. (**C**) Plantules de 6 j. (**D**) Plantules de 8 j. (**E**) Plantules de 10 j. (**F**) Racine primaire de plantule de 4 j. La flèche noire montre l'agencement spécifique du phloème en deux faisceaux parallèles, encadrant le xylème. La flèche blanche montre une zone de discontinuité. (**G**) Pointe racinaire de racine primaire de plantule de 4 j. La flèche noire indique les cellules initiales du centre quiescent et la flèche blanche, celles de la coiffe qui ce sont détachées lors de la préparation de l'échantillon. (**H**) - (**I**) Coupe transversale de hampe florale primaire. Les flèches noires pointent les différents pôles de phloème primaire. La flèche blanche indique le cortex. (**J**) Fleur de stade 15 (Smyth *et al.*, 1990). (**K**) Anthère.

Nous avons également voulu savoir si la protéine JMJ24 peut avoir un effet sur sa propre expression. Pour cela, des plantes *jmj24-2* et *jmj24-3* ont été transformées avec les deux différentes constructions. Les mutants *jmj24-1* et *jmj24-2* portent déjà le gène de résistance à la kanamycine, cependant cette résistance est réprimée pour *jmj24-2* mais pas *jmj24-1*. Par conséquent, seule la transformation de plantes *jmj24-2*, mais pas de plantes *jmj24-1*, a été tentée (**figure 2.1** et **figure 2.16**). Sur cette base nous avons assumé qu'une sélection avec le même antibiotique pourrait donc être possible en T1, voire en T2, avant que le mécanisme de répression ne s'étende à l'ADN-T nouvellement inséré. Il a été assez difficile finalement d'obtenir des transformants pour *jmj24-2* et seule une lignée possédant la construction pro*JMJ24*:*GUS* a été identifiée. La transformation des mutants *jmj24-3* ne posait pas de problème sachant que le gène de résistance porté par l'ADN-T utilisé pour générer la collection de mutants d'insertion GABI est différent (**figure 2.1**). Plusieurs lignées ont pu être obtenues pour chacune des deux constructions.

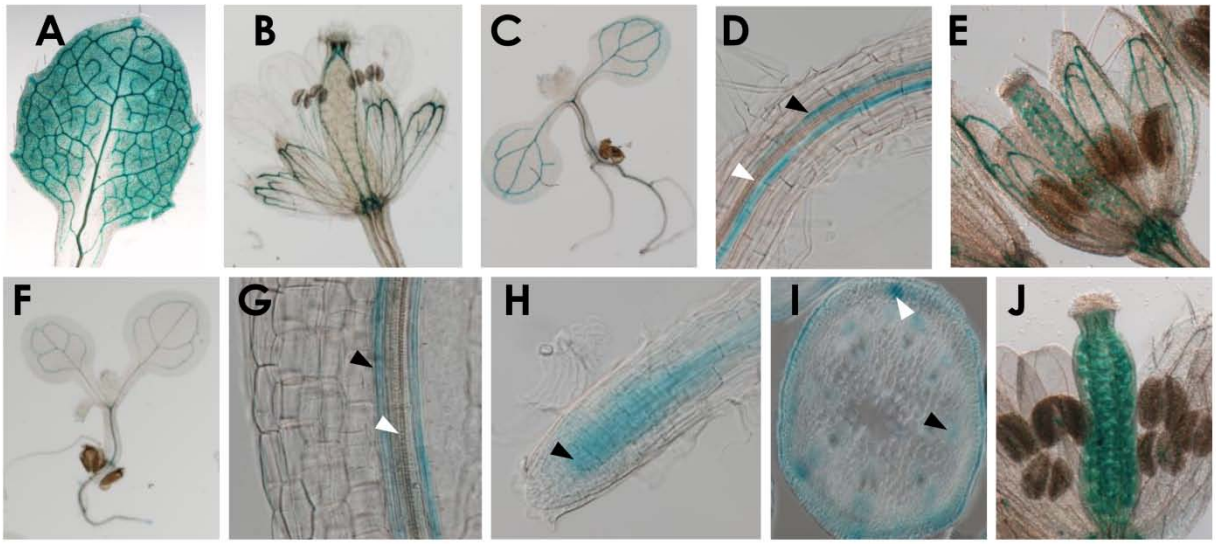


Figure 2.19 : ***Activité du promoteur de JMJ24 dans les mutants jmj24***. (**A**)-(**E**) Mutants *jmj24* transformés avec la construction pro*JMJ24*:*GUS*. (**A**) Mutant *jmj24-2*, feuille de rosette. (**B**) Mutant *jmj24-2*, fleur de stade 15 (Smyth *et al.*, 1990). (**C**) Mutant *jmj24-3*, plantules de 8 j. (**D**) Mutant *jmj24-3*, racine primaire de plantule de 8j. La flèche noire indique le phloème, la flèche blanche, le xylème. (**E**) Mutant *jmj24-3*, fleur de stade 11. (**F**)-(**J**) Mutant *jmj24-3* transformé avec la construction pro*JMJ24*:intron1:*GUS*. (**F**) Plantules de 8 j. (**G**) Racine primaire de plantule de 8 j. La flèche noire indique le phloème, la flèche blanche, le xylème. (**H**) Pointe racinaire de racine primaire de plantule de 8 j. La flèche noire indique les cellules initiales du centre quiescent. (**I**) Coupe transversale de hampe florale primaire. Les flèches noires pointent les différents pôles de phloème primaire. La flèche blanche indique le cortex. (**J**) Fleur de stade 11.

Que ce soit pour les lignées *jmj24-2*pro*JMJ24*:*GUS* ou *jmj24-3*pro*JMJ24*:*GUS*, le patron d'expression est identique à celui obtenu pour les sauvages Ws et Col-0, à savoir une coloration au niveau du système vasculaire (**figure 2.19a-e**), plus précisément du phloème (**figure 2.19d**), et des ovules à des stades précoces du développement floral (**figure 2.19e**). Quant aux lignées *jmj24-3*pro*JMJ24*:intron1:*GUS*, elles aussi présentent un patron d'expression identique à celui des plantes sauvages, avec toujours une coloration au niveau du phloème (**figure 2.19f-g**), des ovules à des stades précoces du développement floral (**figure 2.19j**), et, par la présence du premier intron, dans les cellules du centre quiescent (**figure 2.19h**) et les cellules du cortex de la hampe (**figure 2.19i**). L'ensemble de ces résultats nous permettent de déduire que *JMJ24* n'a donc pas effet sur l'activité de son propre promoteur.

D. Dérégulation de l'expression des gènes dans le mutant jmj24-2

Afin d'obtenir des indices sur la ou les voies génétiques par la(es)quelle(s) JMJ24 influe sur la taille des organes, des expériences de profilages transcriptionnels ont été réalisées. Préalablement à cette analyse, nous avons voulu savoir quel matériel serait le plus adapté, c'est-à-dire à quel stade de développement ou dans quel tissu l'expression de *JMJ24* était la plus forte et donc, dont la perte ou l'altération d'expression seraient susceptibles d'avoir le plus d'impact (**figure 2.20**). Les différents échantillons choisis sont des plantules de 5j et 12j, des feuilles de rosette, des fragments de hampe, des

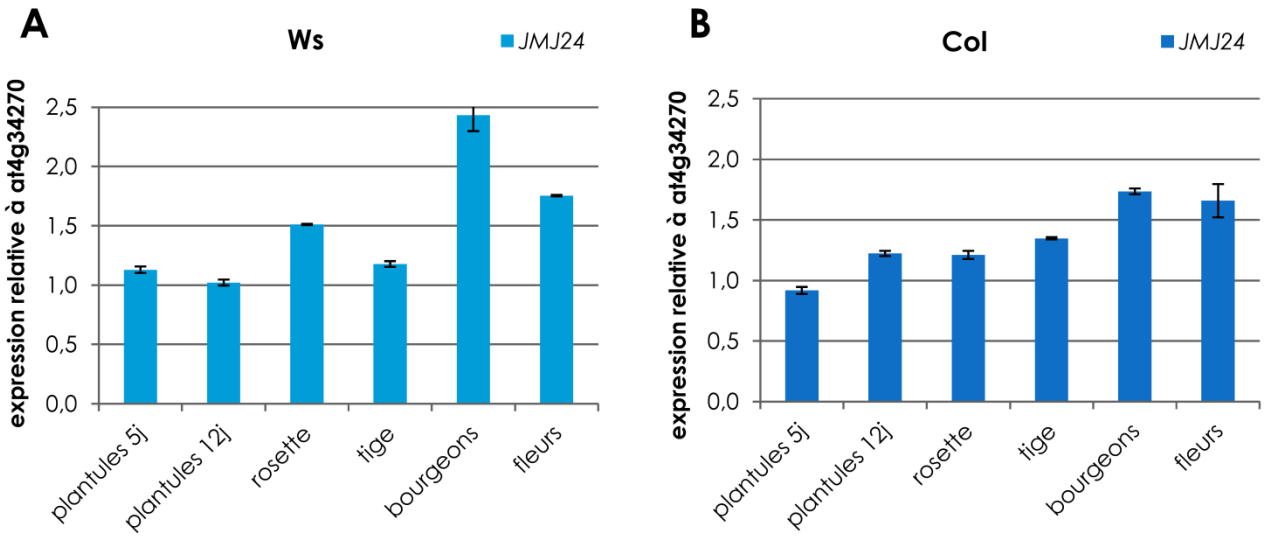


Figure 2.20 : ***Expression de JMJ24 en fonction du tissu ou du stade de développement.*** (**A**) Dans le sauvage Ws (**B**) et dans le sauvage Col-0.

bourgeons floraux et des fleurs. Pour l'écotype Col-0, les niveaux d'expression de *JMJ24* sont assez similaires quelque soit le matériel utilisé, alors que pour l'écotype Ws, *JMJ24* est nettement plus exprimé dans les bourgeons floraux. Néanmoins, nous avons choisi d'utiliser comme matériel la partie aérienne de plantules sauvages Col-0 et mutantes *jmj24-2* de 12j, pour des raisons de rapidité de production du matériel et de quantité d'informations disponibles dans les bases de données sur Col-0 par rapport à Ws. Cette analyse a aussi été réalisée sur des ARN extraits de plantules mutantes *ibm1-4* et double mutantes *jmj24-2ibm1-4* de 12j, dont les résultats seront présentés dans le chapitre **II.B.2.2.** Le choix de puces ATH1 (Affymetrix ®) a été basé sur la plus grande disponibilité en données bioinformatiques pour l'analyse des résultats.

Ce profilage transcriptionnel comparatif a permis de mettre en évidence 23 gènes surexprimés et 35 gènes sous-exprimés dans *jmj24-2* par rapport au sauvage Col-0. Parmi les 23 gènes surexprimés, plus de 40 % sont impliqués dans des processus de réponse à des *stimuli* (**figure 2.21**), dont les réponses de défense (agriGO, http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/search.php). Tandis que pour les gènes sous-exprimés, aucune fonction biologique spécifique commune ne se détache (agriGO), nonobstant

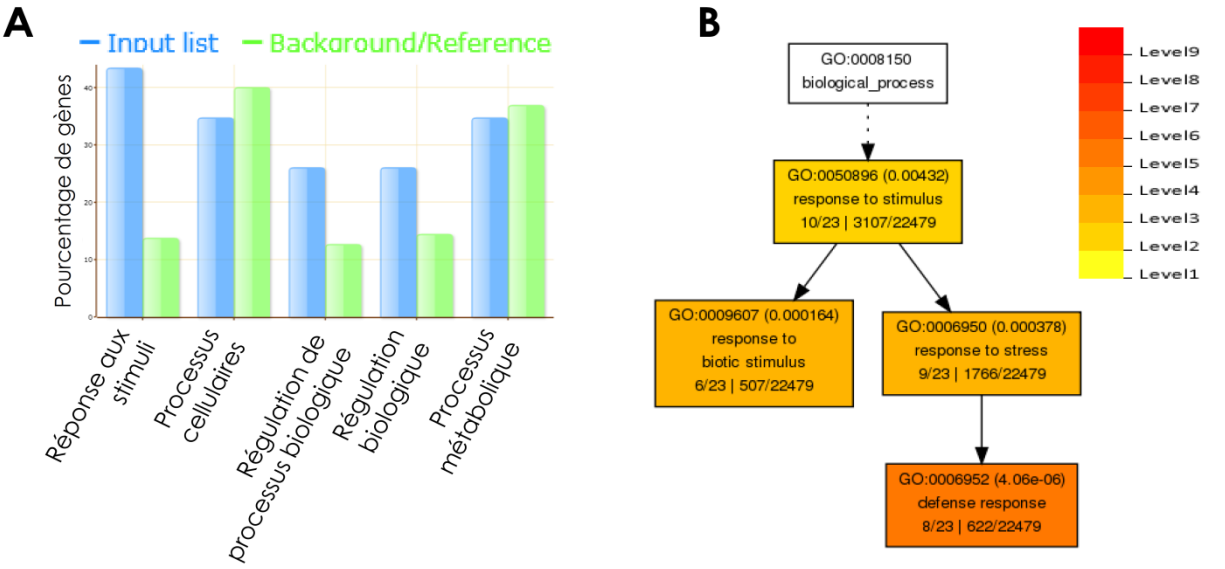


Figure 2.21 : ***Gènes surexprimés dans jmj24-2.*** (**A**) Le nombre de gènes impliqués dans un processus biologique est donné en pourcentage par processus dans les conditions expérimentale (input list) et des conditions normales (background/reference). Le pourcentage de gènes participant à un même processus biologique dans les conditions dites « normales » (**B**) Ontologie des gènes surexprimés. Les couleurs indiquent le niveau de significance.
http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/analysis.php

une implication de beaucoup de ces gènes dans le métabolisme secondaire (*AT1G55120*, *AT1G05680*, *AT3G55710*, etc). Les résultats obtenus par puce à ADN indiquent que *JMJ24* aurait un rôle dans la régulation de l'expression de gènes possédant diverses fonctions.

E. Discussion

La mutation de *JMJ24* entraine des défauts développementaux aussi bien à des stades précoces (graines et plantules), que tardifs (phénotype floral), laissant à supposer un rôle de JMJ24 ubiquitaire notamment dans le contrôle de la taille des organes. De plus, les effets de JMJ24 sur ces organes pourraient être liés au phloème, tissu dans lequel est actif le promoteur *JMJ24*. Nous avons alors cherché à savoir si les gènes impliqués dans la régulation de la croissance des organes et dans la mise en place du phloème, étaient dérégulés dans le fond mutant par profilage transcriptionnel. À part *SEP4* (AT2G03710), aucun gène impliqué dans le contrôle de la croissance des organes (Timmermans *et al.*, 2010), ni de la mise en place et du développement du système vasculaire (Scarpella and Helariutta, 2010), n'ont pu être identifiés comme dérégulés dans le fond mutant *jmj24-2*. Une analyse par RT-PCRq sur certains de ces gènes serait néanmoins intéressante afin d'éliminer la possibilité que le seuil de détection en transcriptomique soit trop faible pour permettre de déceler des changements subtils d'expression mais avoir une influence sur le phénotype.

La taille des organes est également liée à l'activité des méristèmes. Cette activité au niveau floral est régulée par différents facteurs, incluant des facteurs de transcription, des récepteurs kinases et des phytohormones (Tucker and Laux, 2007; Veit, 2009; Benková and Hejátko, 2009; Bartrina *et al.*, 2011). Parmi ces hormones, les cytokinines ont une fonction centrale. Il a été montré qu'une augmentation de la production de cytokinines était associée à la formation d'un méristème végétatif plus large (Rupp *et al.*, 1999). De plus, dans une étude portant sur des mutants des voies de dégradation de la cytokinine, les cytokinine oxidase/déhydrogénases (CKX), et plus particulièrement *CKX3* et *CKX5*, des phénotypes similaires à ceux observés pour le mutant *jmj24-1*, à savoir une désorganisation de la répartition des siliques sur la tige, des organes floraux plus grands et plus nombreux, ont pu être observés (Bartrina *et al.*, 2011). L'expression de ces deux gènes a été testée par RT-PCR dans le mutant *jmj24-1* à partir d'ARN extrait de plantules de 12j, mais celle-ci n'est pas changée (**figure 2.22**), pas plus que d'après les données

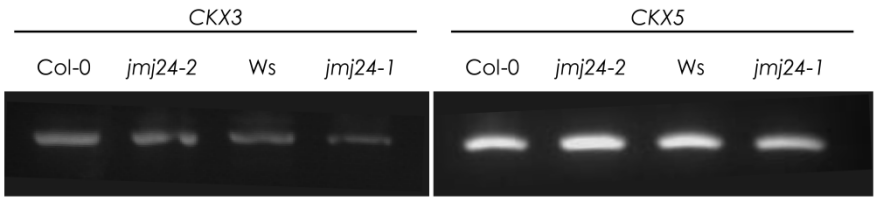


Figure 2.22 : ***Expression des gènes CKX3 et CKX5.*** Des ARN extraits de plantules de 12j ont été utilisé comme matrice de la RT-PCR.

transcriptomiques. Les phénotypes observés dans le mutant *jmj24-1* ne sont donc pas imputables à des variations de l'homéostasie des cytokinines.

L'obtention avec la puce à ADN ATH1 d'un faible nombre de gènes dont l'expression est affectée dans le mutant jmj24-2 peut être liée à plusieurs facteurs : (1) un impact de l'expression résiduelle de *JMJ24* dans le mutant *jmj24-2* par rapport au mutant *jmj24-1* qui minimiserait les effets de la mutation ou (2) l'absence sur la puce ATH1 des cibles de *JMJ24*, celle-ci ne couvrant pas tous les gènes transcrits et se basant sur une annotation désuète du génome d'*Arabidopsis* (Redman *et al.*, 2004). En effet, les séquences répétées, les éléments transposables et les séquences non codantes étant faiblement représentés dans celle-ci, la question d'une implication de *JMJ24* dans ces régions reste ouverte. Il serait donc intéressant de refaire l'analyse de profilage transcriptionnel à partir de matériel issu du mutant *jmj24-1* et de changer de puce à ADN. Une puce tiling serait une bonne alternative car contrairement à la puce ATH1, elle permet la détection de régions génomiques transcrites non reportées lors de précédentes annotations, de détecter des ARN non-codant, ainsi que d'identifier des isoformes alternatives d'ARN de gènes connus (Bertone *et al.*, 2004; Kapranov *et al.*, 2002). Cependant, sachant qu'il existe une plus grande quantité d'informations disponibles sur Col-0 dans les différentes bases de données, il serait peut-être plus judicieux d'effectuer l'analyse transcriptomique dans cet écotype, et donc d'utiliser les lignées d'introgression *jmj24-1C*.

De plus, au vu du patron d'expression du promoteur *JMJ24* restreint au phloème, les effets de la mutation de *JMJ24* sur l'expression de ses gènes cibles pourraient être dilués par rapport aux niveaux d'expression des cellules voisines dans lesquelles le gène *JMJ24* ne s'exprime pas. Il pourrait alors être intéressant de mettre en place la méthode dite INTACT qui permet l'isolation de noyaux d'un type cellulaire spécifique (Deal and Henikoff, 2011). Cette méthode de purification permettrait ainsi l'isolation de noyaux issus uniquement du phloème et pourrait être suivie par une analyse transcriptomique. Cette

méthode étant cependant très longue à mettre en place, l'utilisation de matériel pour lequel le *ratio* entre phloème, où est exprimé *JMJ24*, et tissus où il ne l'est pas soit le plus grand possible, serait plus raisonnable. De ce point de vue, l'emploi de plantules de 5j serait le plus approprié. De plus, le niveau d'expression de *JMJ24* à ce stade est équivalent à celui des plantules de 12j (**figure 2.20**).

II. JMJ24 EST-ELLE IMPLIQUÉE DANS LA MÉTHYLATION DES HISTONES?

Les protéines JMJ ont été classées en différentes familles sur la base de l'homologie de leur domaine catalytique JmjC (Sun and Zhou, 2008) (**figure 1.18**). À l'intérieur de celles-ci, les membres identifiés ne sont capables de cibler généralement qu'un ou deux résidus cibles spécifiques, avec un maximum de trois (**tableau 2.1**). Pour la famille KDM3, dont fait partie *JMJ24*, toutes les protéines caractérisées, de l'humain aux plantes, ont été identifiées comme des déméthylases du résidu H3K9 (Yamane *et al.*, 2006; Saze *et al.*, 2008; Sun and Zhou, 2008; Inagaki *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013). L'hypothèse d'une implication de *JMJ24* dans la déméthylation H3K9 a alors été posée ainsi que l'existence d'interactions entre *JMJ24* et d'autres gènes de la famille.

A. Interaction génétique entre JMJ24 et les gènes du cluster à domaine JmjC seul

La recherche d'interaction entre JMJ24 et JMJ20, membre du cluster des protéines JMJ à domaine "JmjC seul", s'est fait sur la base des données d'expression disponibles sur le site eFP Browser (http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi ; Winter *et al.*, 2007) (**figure 2.23**). D'après ces données, *JMJ24* et *JMJ20* possèdent des patrons d'expression très proches et pourraient donc être impliqués dans une ou plusieurs voie(s) commune(s). Le croisement entre les mutants *jmj24-1* et *jmj20-1* (SALK_024612), a été réalisé. Il est à noter que les mutants utilisés sont dans des écotypes

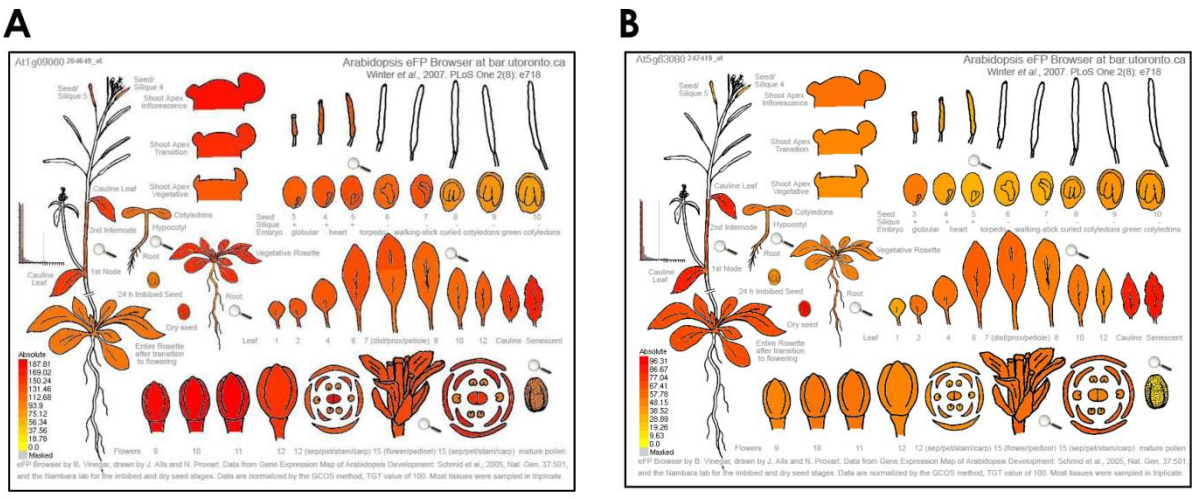


Figure 2.23 : ***Données d'expression par tissu visualisées grâce à la base de données eFP Browser (http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi)***. (**A**) Expression de *JMJ24*. (**B**) Expression de *JMJ20*.

différents, puisque *jmj24-1* se trouve dans l'écotype Ws et *jmj20-1* dans l'écotype Col-0, seul allèle disponible au laboratoire. Le choix s'est porté sur *jmj24-1* et non *jmj24-2* afin de maximiser les chances d'observer un effet de la double mutation. Dans nos conditions de culture, ni le simple mutant *jmj20-1*, ni le double mutant *jmj24-1jmj20-1* ne présentent de phénotype. La présence d'une interaction fonctionnelle entre *JMJ24* et *JMJ20* n'a donc pas pu être mise en évidence.

B. Interaction génétique entre JMJ24 et les gènes JMJ membres du cluster spécifique des plantes

Sur le postulat que JMJ24 serait une déméthylase H3K9 (di- ou triméthyle), des interactions avec des protéines JMJ d'autres clusters ont été recherchées. Le choix s'est porté sur les déméthylases JMJ du cluster spécifique des plantes, impliquées dans la déméthylation H3K4, à savoir JMJ14, JMJ15 et JMJ18 (Jeong *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2012a; Yang *et al.*, 2012b), mais aussi JMJ19 qui, faisant également partie de cette famille, pourrait probablement avoir le même résidu cible. De plus, *JMJ18* possédant comme *JMJ24* un patron d'expression lié au phloème, il apparait comme un bon candidat pour l'étude de cette interaction (Yang *et al.*, 2012a). En effet, au niveau des gènes et des éléments transposables, méthylation H3K9me2 et méthylation H3K4me2/3 possèdent des effets antagonistes (**figure 2.24**). Par exemple, dans le mutant *jmj14*,

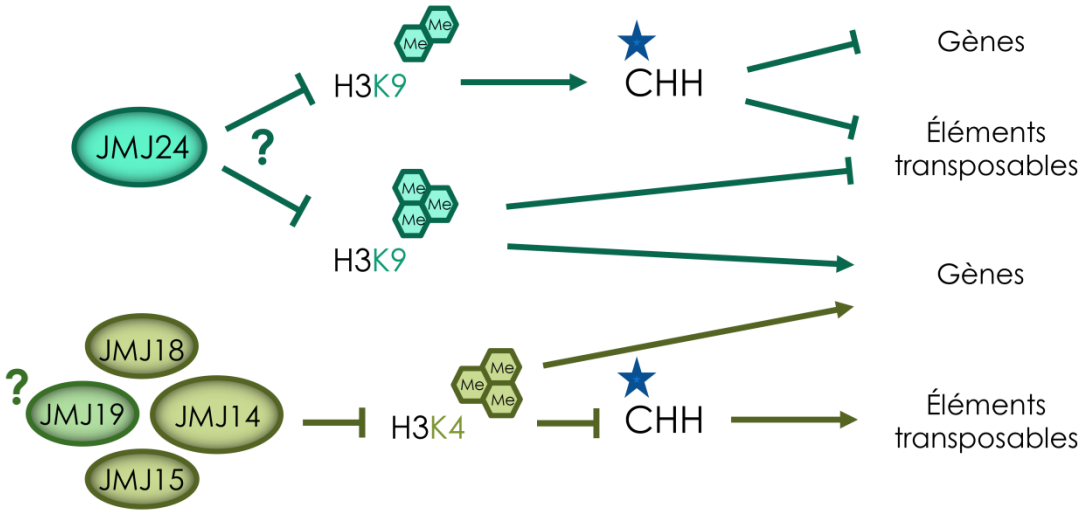


Figure 2.24 : ***Interactions entre méthylation H3K9, méthylation H3K4 et méthylation ADN***. Les hexagones et les étoiles représentent les groupements méthyles des histones et de l'ADN respectivement.

l'augmentation de la méthylation H3K4me3 au niveau d'éléments transposables entraine une diminution de la méthylation ADN (Searle *et al.*, 2010; Deleris *et al.*, 2010), alors que la présence de méthylation H3K9me2 favorise cette méthylation ADN via le recrutement de CMT3 (Jackson *et al.*, 2004; Lindroth *et al.*, 2004; Du *et al.*, 2012). Cependant, en ce qui concerne H3K9me3, cette marque peut être corrélée à la transcription génique et posséder une faible fonction activatrice (Caro *et al.*, 2007; Charron *et al.*, 2009), et être impliquée dans des mécanismes épigénétiques de défense participant à l'inactivation d'éléments transposables (Veiseth *et al.*, 2011) (**figure 2.24**). Par conséquent, en fonction de la cible de JMJ24 (H3K9me2/H3K9me3 et gènes/éléments transposables), une double mutation pourra soit aggraver le ou les effets des simples mutations, soit le ou les atténuer, soit n'avoir aucun impact. Les lignées doubles mutantes pour le gène *JMJ24* et les gènes de la famille des JMJ spécifique des plantes ont été générées à partir d'allèles du même écotype. Il est à noter que pour les gènes *JMJ15* et *JMJ18*, les allèles utilisés pour les croisements ne sont pas ceux publiés (**tableau 4.1 - matériel et méthodes**).

Figure 2.25 : ***Étude des doubles mutants jmj24-2jmj19-2 et jmj24-2jmj15-3.*** En JL, les doubles mutants *jmj24-2jmj19-2* (**A**) et *jmj24-2jmj15-3* (**B**) ne présentent aucun phénotype.

1. Étude des double mutants *jmj24jmj15*, *jmj24jmj18* et *jmj24jmj19*

L'analyse de l'expression de *JMJ15* dans les différents mutants a montré que l'insertion de l'ADN-T entrainait une augmentation d'expression de *JMJ15* dans les lignées *jmj15-1* et *jmj15-2*, contre une diminution chez *jmj15-3* (résultats de Yuan SHEN). L'étude phénotypique a donc porté sur le double mutant *jmj24-2jmj15-3*, car nous voulions connaître l'impact de la double diminution d'expression de ces gènes sur la plante adulte.

Dans nos conditions de culture, les simples mutants *jmj15-3* et *jmj18-b* présents dans l'écotype Col-0 ne présentent pas de phénotypes macroscopiques visibles, tout comme les doubles mutants *jmj24-2jmj15-3* et *jmj24-2jmj18-b*. La présence d'une interaction entre *JMJ24* et *JMJ15* et *JMJ24* et *JMJ18* n'a pas pu être mise en évidence au niveau morphologique (**figure 2.25**).

Pour *JMJ19*, étaient disponibles au laboratoire deux allèles : *jmj19-1* dans l'écotype Ws et jmj19-2 dans l'écotype Col-0. Deux doubles mutants ont donc été réalisés : *jmj24-1jmj19-1* et *jmj24-2jmj19-2*. Les simples mutants *jmj19-1* et *jmj19-2* ne présentent aucun phénotype visible par rapport aux sauvages Ws et Col-0. Le double mutant *jmj24-1jmj19-1* présente des phénotypes associés au simple mutant *jmj24-1*, dont le phénotype floral, à savoir la présence de fleurs à cinq pétales, et des plantes de stature plus grande. Le double mutant *jmj24-2jmj19-2* quant à lui ne présente aucun phénotype macroscopique visible. La présence d'une interaction fonctionnelle entre *JMJ24* et *JMJ19* n'a pas pu être mise en évidence (**figure 2.25**).

2. Étude des double mutants *jmj24jmj14*

Deux doubles mutants ont été produits : un dans l'écotype Col-0, *jmj24-2jmj14-1*, et un dans l'écotype Ws, *jmj24-1jmj14-2*. Les mutants *jmj14-1* et jmj14-2 présentent une précocité de floraison aussi bien en JL qu'en JC (Jeong *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2010), tandis que les mutants *jmj24-2* et *jmj24-1* ne présentent pas de différence par rapport aux lignées sauvages Col-0 et Ws. En ce qui concerne le double mutant *jmj24-2jmj14-1* dans l'écotype Col-0, celui-ci présente également une précocité de floraison par rapport au sauvage, mais celle-ci est attenuée par rapport au simple mutant *jmj14-1* (**figure 2.26**).

Figure 2.26 : ***Étude du double mutant jmj24-2jmj14-1***. En JC, le phénotype de floraison précoce de jmj14-1 est atténué dans le double mutant. L'encart présente un agrandissement du haut de la hampe florale, pointée par la flèche.

C. Interaction génétique entre JMJ24 et les gènes JMJ du cluster KDM3

La recherche d'interaction entre *JMJ24* et d'autres membres de la famille KDM3 a été testée pour une potentielle redondance fonctionnelle. Les gènes sélectionnés sont *IBM1/JMJ25* et *JMJ28*. *IBM1* car sa fonction dans la déméthylation de H3K9 a déjà été montrée (Saze *et al.*, 2008; Inagaki *et al.*, 2010), et *JMJ28* car c'est le plus proche homologue de *JMJ24* (**figure 1.18**). Des croisements entre les mutants *jmj24* et les mutants *ibm1* et *jmj28* ont donc été réalisés.

1. Étude du double mutant *jmj24jmj28*

Pour *JMJ28*, seul un allèle dans Ws, nommé *jmj28-1* (FLAG_565B03), était disponible au laboratoire au moment de cette étude. Le croisement a donc été réalisé entre les simples mutants *jmj24-1* et *jmj28-1*. Le simple mutant *jmj28-1* ne présente aucun phénotype visible. Quant au double mutant *jmj24-1jmj28-1*, aucune aggravation ni restauration des phénotypes de *jmj24-1* n'a pu être observée. Les gènes *JMJ24* et *JMJ28* ne présenteraient donc pas de fonction redondante visible dans nos conditions de cultures.

2. Étude du double mutant *jmj24ibm1*

2.1. Description des phénotypes du double mutant *jmj24ibm1*

Les phénotypes du simple mutant *ibm1-4* ont été largement décrits par Saze *et al.* (2008), à savoir entre autres une déformation des feuilles, des fleurs anormales et une

fertilité réduite, engendrés par une augmentation de la méthylation H3K9me2 et de la méthylation ADN en contexte CHG au niveau de séquences géniques, dont le gène *BONSAI* qui, lorsqu'il est réprimé est responsable de la perte de dominance apicale et du nanisme des plantes (Saze and Kakutani, 2007; Miura *et al.*, 2009; Inagaki *et al.*, 2010).

Concernant le double mutant *jmj24-2ibm1-4*, dans la deuxième génération dans laquelle les deux allèles mutants sont à l'état homozygote, une restauration partielle du phénotype sauvage au stade rosette a été observée (**figure 2.27a**). En effet, les feuilles de rosette sont plus grandes et moins déformées que celle du simple mutant *ibm1-4*, cependant elles restent légèrement moins larges que les feuilles de rosette du sauvage Col-0 (**figure 2.27b**). En ce qui concerne la partie reproductive, celle-ci présente toujours des défauts développementaux avec des fleurs majoritairement anormales, associés à une stérilité partielle (**figure 2.27c**).

La restauration du phénotype foliaire au niveau de la rosette indique une possible interaction antagoniste entre *JMJ24* et *IBM1* sur des cibles ou des voies communes. En revanche, au niveau de la partie reproductive, *JMJ24* et *IBM1* agissent soit dans des voies différentes, soit sur des cibles différentes. Il est également possible qu'elles agissent sur des cibles communes, mais que leurs actions enzymatiques soient temporellement ou spatialement différentes. La recherche de gènes cibles de JMJ24 et IBM1 devrait permettre d'étudier, au niveau moléculaire, l'interaction entre ces deux protéines.

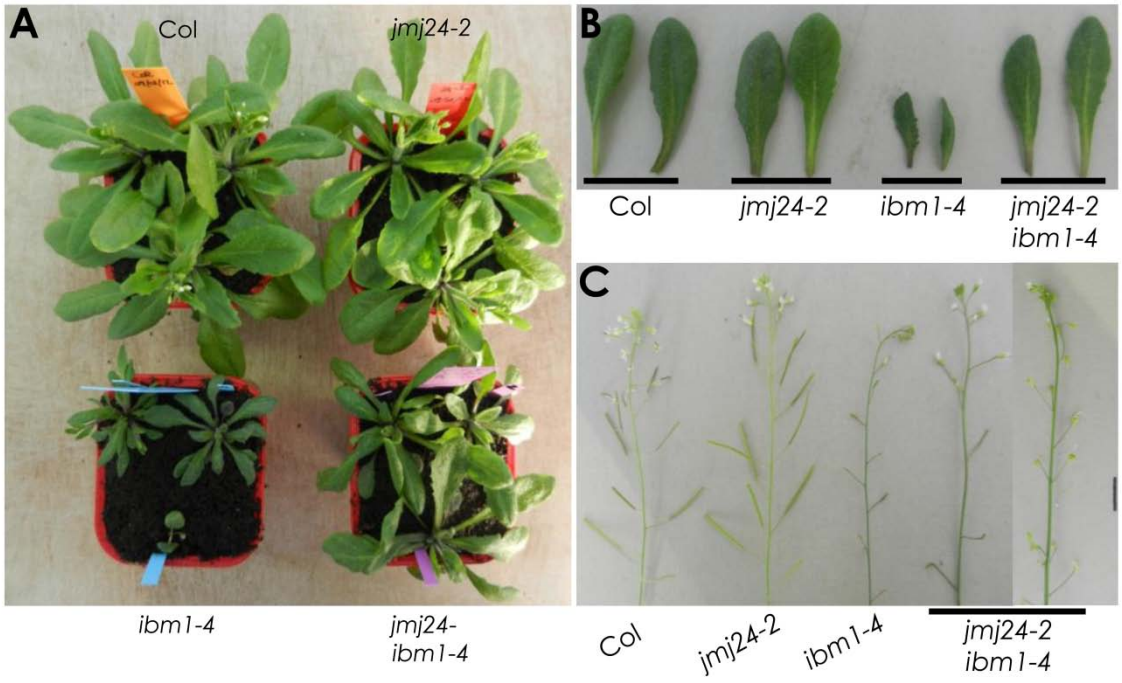
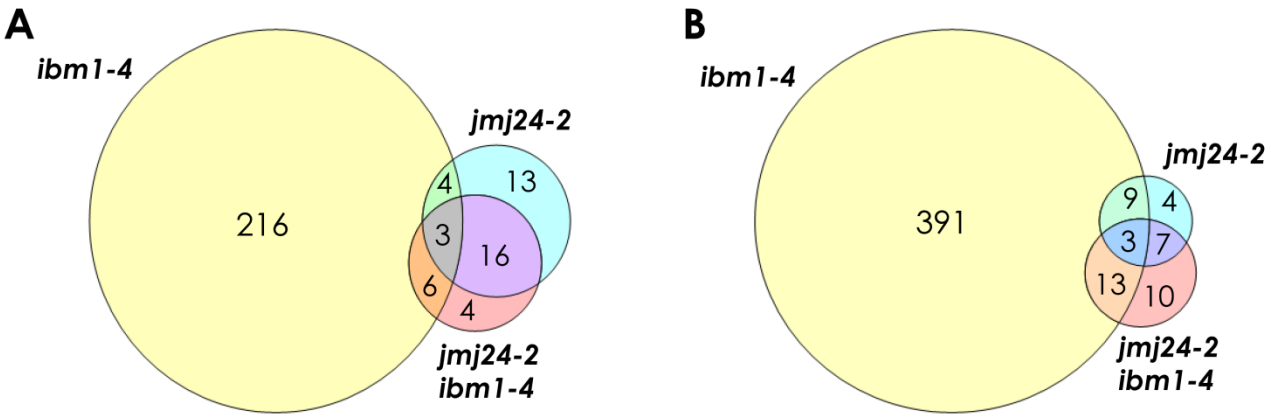


Figure 2.27 : ***Restauration partielle des phénotypes dans le double mutant jmj24-2ibm1-4***. Phénotypes des plantes à 4 semaines (**A**), des feuilles de rosette (**B**) et des inflorescences (**C**) dans le sauvage Col-0, les simples mutants *jmj24-2* et *ibm1-4* et le double mutant *jmj24-2ibm1-4*.

2.2. JMJ24 et IBM1 déméthylent-elles le même résidu cible ?

Afin d'identifier des gènes cibles de JMJ24 et IBM1, nous nous sommes servi de l'analyse transcriptionnelle décrite précédemment dans le paragraphe **I.D.** Ce profilage comparatif a permis de mettre en évidence que sur les 229 gènes surexprimés dans le



C

Code AGI	Annotation TAIR	*jmj24* vs Col-0	Bonferroni	*ibm1* vs Col-0	Bonferroni	*jmj24ibm1* vs Col-0	Bonferroni	
At5g61600	**ERF104**, ethylene-responsive element-binding family protein	1,31		0,72		1,53		
At2g02100	**PDF2.2**, plant defensin	0,86		1,21		0,98		
At4g10270	wound-responsive family protein	0,75		2,47		1,19		
At1g52410	**TSA1** (TSK-ASSOCIATING PROTEIN 1)	0,65		1,5		0,68		class II
At3g47860	**AtCHL**, apolipoprotein D-related	-0,37		-1,68		-0,27		class I
At1g33811	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein	-0,67		-1,61		-1,07		
At5g27410	aminotransferase class IV family protein	-1,19		-1,36		-1,13		class II
At2g03710	MADS-box protein (AGL3); **SEP4** (SEPALLATA4)	-1,33		-0,07		-1,27		

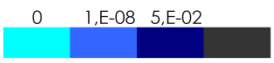


Figure 2.28 : ***Identification de gènes transcriptionnellement déregulés dans les mutants jmj24-2, ibm1-4 et jmj24-2ibm1-4 par analyse transcriptomique.*** Diagramme de Venn des gènes surexprimés (**A**) et sous-exprimés (**B**) dans *jmj24-2*, *ibm1-4* et *jmj24-2ibm1-4* par rapport au sauvage. (**C**) Gènes sélectionnés. En rouge sont signalés les gènes surexprimés et en vert les gènes sous-exprimés. Les termes class I et class II correspondent aux différentes classes de gènes, établies par Miura *et al.* (2009), dont les niveaux de méthylation ADN sont affectés dans le mutant *ibm1*.

mutant *ibm1-4* par rapport au sauvage Col-0, seuls 9 le restent dans le double mutant *jmj24-2ibm1-4*, de même pour les 416 gènes sous-exprimés dans *ibm1-4* par rapport ausauvage Col-0, seuls 16 le restent dans le double mutant *jmj24-2ibm1-4* (**figure 2.28a-b**). Ce retour, dans le double mutant, à des niveaux d'expression normaux de la quasi-totalité des gènes dérégulés dans *ibm1-4*, est cohérent avec la restauration du phénotype foliaire observée dans le double mutant *jmj24-ibm1-4,* sachant que le transcriptome a été réalisé à partir de la partie aérienne plantules de 12j. La mutation de *JMJ24* dans un fond mutant *ibm1-4* permet donc une compensation partielle des variations transcriptionnelles (sur-expression et répression) dans le mutant *ibm1-4*, qui se traduit par une restauration partielle du phénotype foliaire d'*ibm1-4* dans le double mutant *jmj24-2ibm1-4*. Nous avons également pu remarquer que si un même gène se trouvait dérégulé dans les trois génotypes testés, cette dérégulation se faisait toujours dans le même sens : pour un gène surexprimé dans *jmj24-2*, si celui-ci est aussi dérégulé dans *ibm1-4*, il sera également surexprimé et non sous-exprimé.

Les gènes ont ensuite été regroupés en différentes classes en fonction de leur profil de co-régulation dans les fonds simple mutant *jmj24-2* et double mutant *jmj24-2ibm1-4* par rapport au simple mutant *ibm1-4*. Un gène représentatif de chaque classe a été sélectionné parmi ceux dont les variations d'expression par rapport au sauvage étaient les plus fortes, dans un sens comme dans l'autre (**figure 2.28c**). Pour chacun des gènes sélectionnés, à savoir *PDF2.2* (*AT2G02100*), *SEP4*, *AT1G33811*, *AtCHL* (*AT3G47860*), *AT4G10270*, *ERF104* (*AT5G61600*), *AT5G27410* et *TSA1* la vérification des niveaux de transcrits a été effectuée par RT-PCRq (**figure 2.29**). Les résultats obtenus corrèlent avec les variations d'expression observées par transcriptomique pour *PDF2.2*, *AT4G10270*, *AT1G33811*, *AT5G27410* et *SEP4*. Cependant pour *TSA1* et *AtCHL*, une augmentation et une diminution respectivement des niveaux d'expression est observée dans le double mutant *jmj24-2ibm-4* en RT-PCRq (**figure 2.29**). Globalement, les résultats observés en transcriptomique sont confirmés en RT-qPCR.

Les gènes ainsi sélectionnés ont servi de base pour caractériser, au niveau de la chromatine, à quelle MPT des histones est associée JMJ24, ainsi qu'à tenter de vérifier si l'hypothèse d'une redondance fonctionnelle avec IBM1 au niveau du résidu ciblé est vraie. Dans cette optique, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) dirigées contre différentes MPTs des histones et ciblées sur le promoteur ou la partie codante de ces gènes ont été réalisées. Pour déterminer les régions précises à amplifier à l'issu des ChIP, des données de ChIP-on-chip de Inagaki *et al.*, (2010) obtenues pour la marque H3K9me2 chez le sauvage Col-0 et le simple mutant *ibm1-4*,

ont été traitées par V. Thareau (Plateforme de Bioinformatique de l'IBP), afin d'établir la distribution de cette marque le long des gènes d'intérêts choisis. La **figure 2.30** présente les distributions obtenues pour quatres des gènes candidats : *PDF2.2*, *SEP4*, *AT1G33811* et *AtCHL*. Parmi ces quatre gènes, *AtCHL* appartient à une des trois classes définies en fonction de l'impact de la mutation d'*IBM1* sur la méthylation ADN par Miura *et al.*, (2009). *AtCHL* fait partie de la classe I, classe pour laquelle une forte méthylation de l'ADN, ainsi qu'une forte augmentation de la méthylation H3K9me2, au niveau de la partie centrale du gène ont été observées chez le mutant *ibm1-4* (Miura *et al.*, 2009; Inagaki *et al.*, 2010). Les couples d'oligonucléotides nécessaires au ChIP ont été dessinés dans les régions présentant les plus grandes amplitudes de niveaux de méthylation H3K9me2 entre sauvage Col-0 et mutant *ibm1-4*.

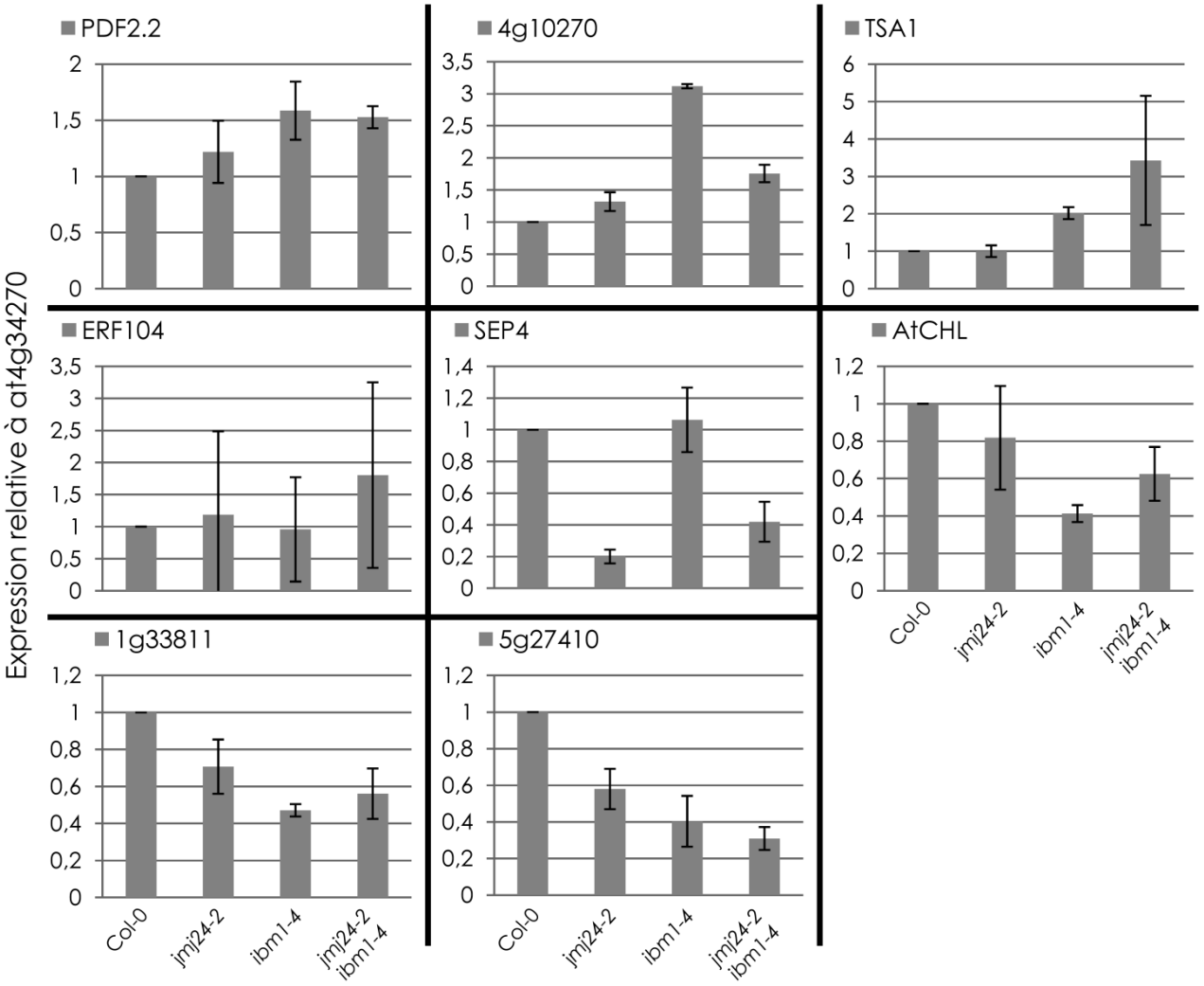


Figure 2.29 : ***Niveaux d'expression des gènes candidats.*** Les niveaux d'expression des gènes précédemment sélectionnés ont été obtenus par RT-PCRq à partir d'ARN extraits de plantules de 12j. Les données présentent les niveaux d'expression rapportés au sauvage pour deux ou quatre répétitions biologiques en fonction des gènes.

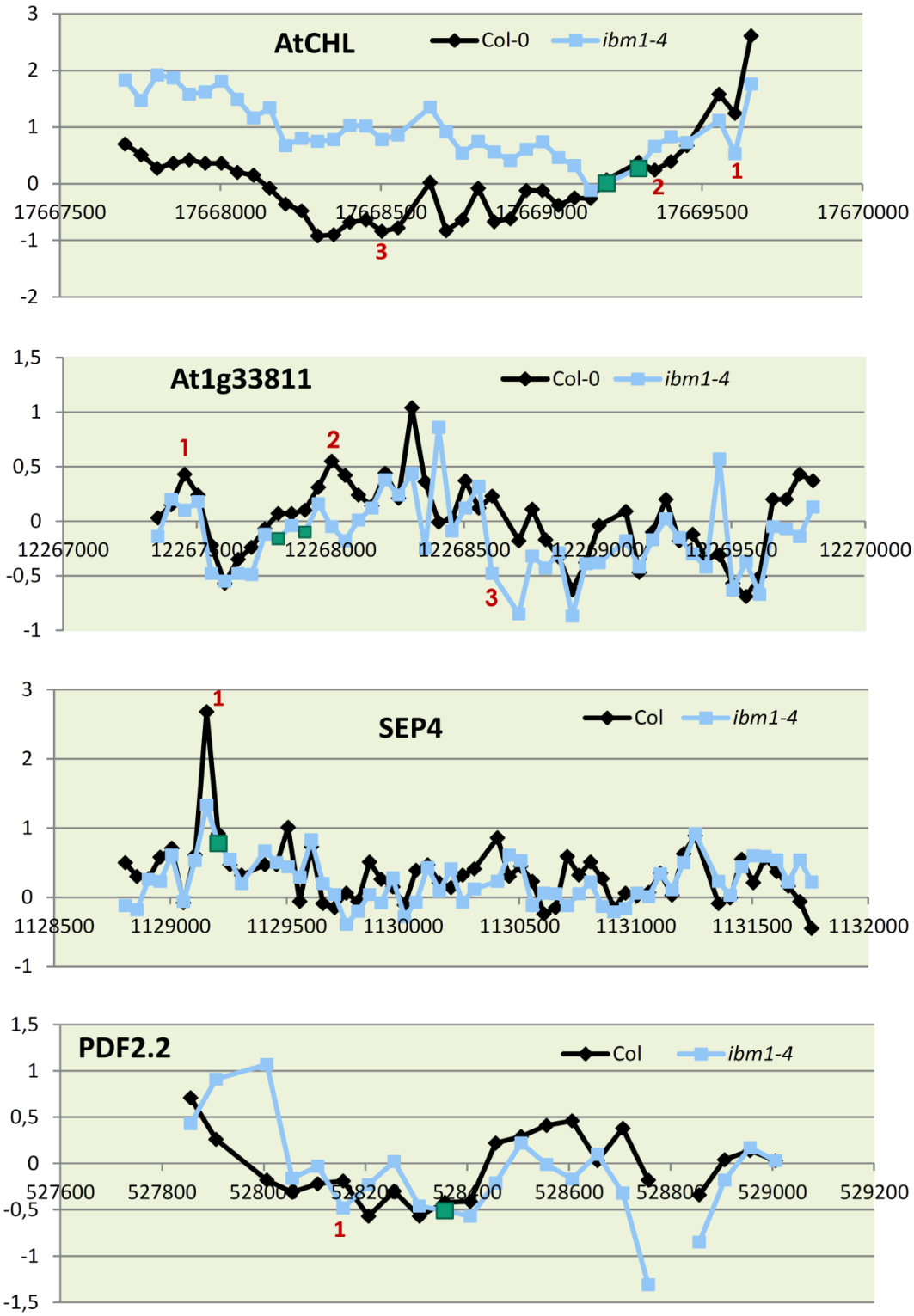


Figure 2.30 : ***Distribution de la méthylation H3K9me2***. Résultats de ChIP-on-chip pour PDF2.2, SEP4, AtCHL et At1g33811 dans la sauvage Col-0 et le mutant *ibm1-4*. Chaque point correspond à une sonde spécifique. Les numéros en rouge indiquent la position des couples d'oligonucléotides déssinés pour les expériences de ChIP. Les carrés verts indiquent la position approximative du TSS et de l'ATG. Données obtenues à partir de Inagaki *et al.* 2010, (GSE22953) avec l'aide de V. Thareau.

L'analyse de la méthylation H3K9me2 par ChIP révèle une augmentation de cette marque dans *ibm1-4* par rapport à Col-0, pour *AtCHL* (1,7 à 4,8 fois plus – **figure 2.31a**), et une diminution de celle-ci pour *AT1G33811* et *SEP4* (en moyenne sur les différentes régions testées : 1,7 et 3,3 fois moins respectivement - **figure 2.31b**) confirmant les données obenues par Inagaki *et al.* (2010). Par contre aucune variation n'a été détectée pour *PDF2.2* (**figure 2.31c**). Dans le mutant *jmj24-2* comme dans le double mutant *jmj24-2ibm1-4*, une diminution de la méthylation H3K9me2, par rapport au sauvage Col-0 et au mutant *ibm1-4*, a pu être constatée pour chacune des séquences

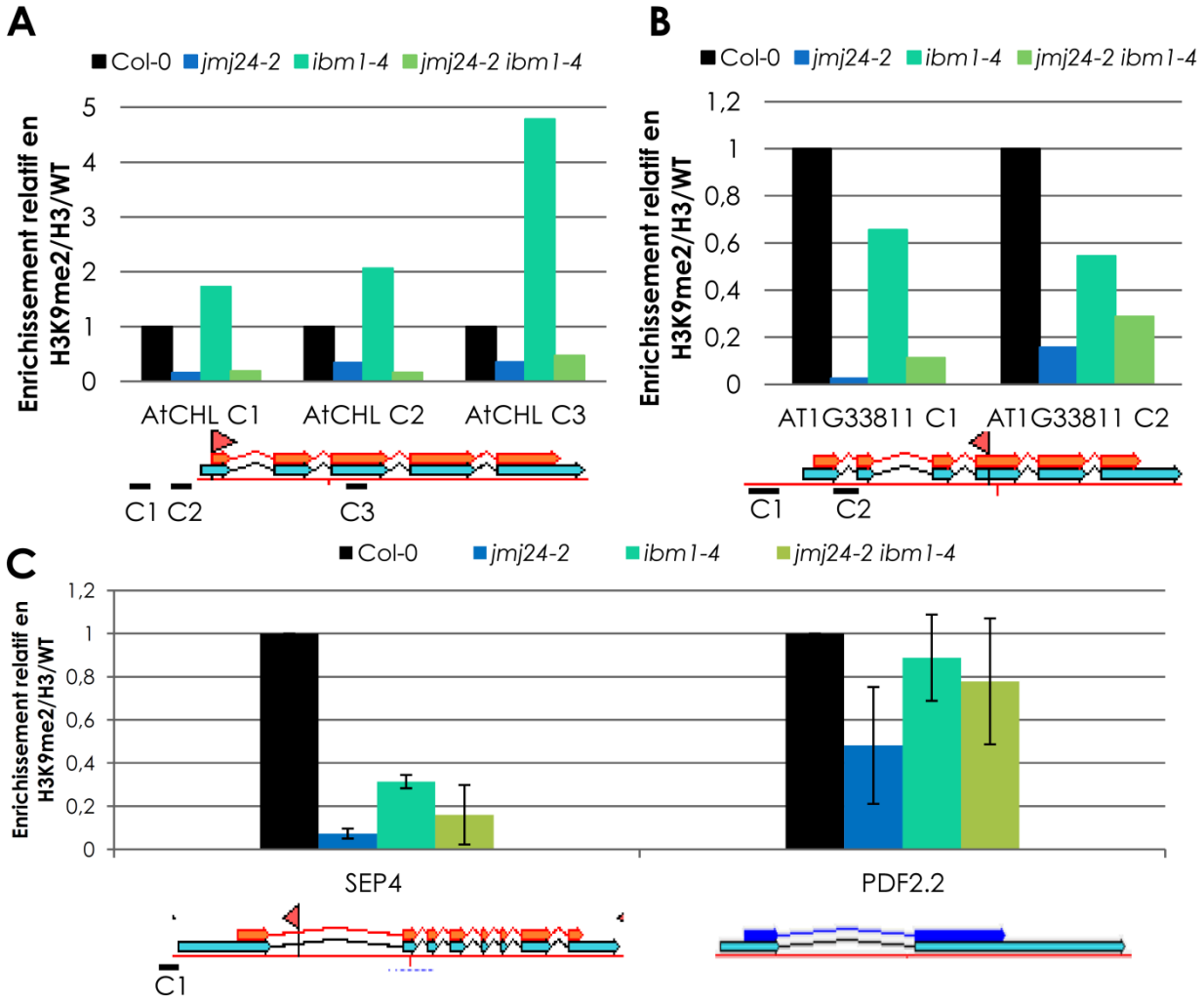


Figure 2.31 : ***Méthylation H3K9me2 de plantules mutantes jmj24-2, ibm1-4, jmj24-2ibm1-4 et sauvages Col-0 de 12j pour 4 loci***. Le niveau de méthylation H3K9me2 des gènes AtCHL (**A**), AT1G33811 (**B**), SEP4 et PDF2.2 (**C**) a été déterminé par ChIP grâce à un anticorps spécifique dirigé contre cette marque et est représenté comme l'enrichissement relatif rapporté à l'enrichissement en histones H3 totales par rapport au sauvage. La structure de chaque gènes et la position des couples d'oligonucléotides utilisés sont représentées en dessous du graphique correspondant. Les données représentent une répétition biologique (AtCHL, AT1G33811) ou deux (SEP4, PDF2.2).

ciblées (**figure 2.31a-c**). La mutation de *JMJ24* entraine donc une diminution de la métylation H3K9me2 au niveau de ces gènes, alors qu'une augmentation aurait plutôt été attendue dans le cas d'une activité de déméthylase H3K9me2. Cette marque ne semble donc pas être la cible directe de la déméthylase JMJ24 au niveau de ces gènes.

La méthylation H3K9me2 étant une marque associée à la répression de la transcription, une augmentation ou une diminution de sa présence au niveau d'un gène pourrait respectivement conduire à une sous- ou surexpression de celui-ci. Cependant, si pour certains des gènes étudiés la hausse des niveaux de méthylation H3K9me2 corrèle bien avec une diminution de son expression, comme c'est le cas pour *AtCHL* dans *ibm1-4* (**figures 2.29 et 2.31a**), l'inverse n'est pas forcément vr ai. En effet pour *AT1G33811* et *SEP4*, la diminution des niveaux de méthylation H3K9me2 dans *jmj24-2* et *jmj24-2ibm1-4* est notamment corrélée à une diminution de l'expresion de ces gènes (**figures 2.29 et 2.31b-c**). Les variations d'expression observées pour ces gènes ne peuvent donc pas être imputées aux seules variations de la méthylation H3K9me2.

D'autres MPTs des histones doivent donc être impliquées dans cette régulation. Or, les marques H3K9me2 et H3K4me3 étant associées à des états d'expression opposés, nous nous sommes demandés si la baisse de H3K9me2 dans le mutant *jmj24-2* pouvait corréler avec une variation de la tri-méthylation H3K4. JMJ14 ayant été identifiée comme étant une déméthylase H3K4me3, dont la mutation entraine une augmentation de cette marque (Jeong *et al.*, 2009), le mutant *jmj14-1* a servi de contrôle de la variation de H3K4me3. De plus, comme *JMJ14* et *JMJ24* sembleraient intervenir de manière opposée dans le transition florale (**§ B.2**), les niveaux de méthylation H3K4me3 ont donc été mesurés dans les mutants *jmj24-2*, *ibm1-4*, *jmj24-2ibm1-4*, *jmj14-1* et *jmj24-2jmj14-1* comparés au sauvage Col-0 (**figure 2.32**).

Dans le mutant *jmj14-1*, une augmentation plus ou moins prononcée de la méthylation H3K4me3 est visible au niveau de *AtCHL*, *AT1G33811*, *PDF2.2* et *SEP4* (en moyenne sur les différentes régions testées : 2,2 ; 1,9 ; 1,5 et 1,2 fois plus respectivement – **figure 2.32**). Concernant le mutant *jmj24-2*, une légère augmentation de cette MPT d'histone a été constatée pour *AtCHL*, *AT1G33811* et *PDF2.2* (environ 1,4 ; 1,2 et 1,7 fois plus respectivement), mais pas *SEP4* pour lequel une diminution de 70% est observée (**figure 2.32**). Dans le double mutant *jmj24-2jmj14-1* une augmentation de la méthylation H3K4me3 est également visible pour AtCHL, AT1G33811 et PDF2.2 (1,6 ; 1,4 et 1,9 fois plus), bien qu'atténuée par la présence de la mutation *jmj24-2* pour *AtCHL*, *AT1G33811*, ce qui est surprenant au regard de l'augmentation constatée dans *jmj24-2*

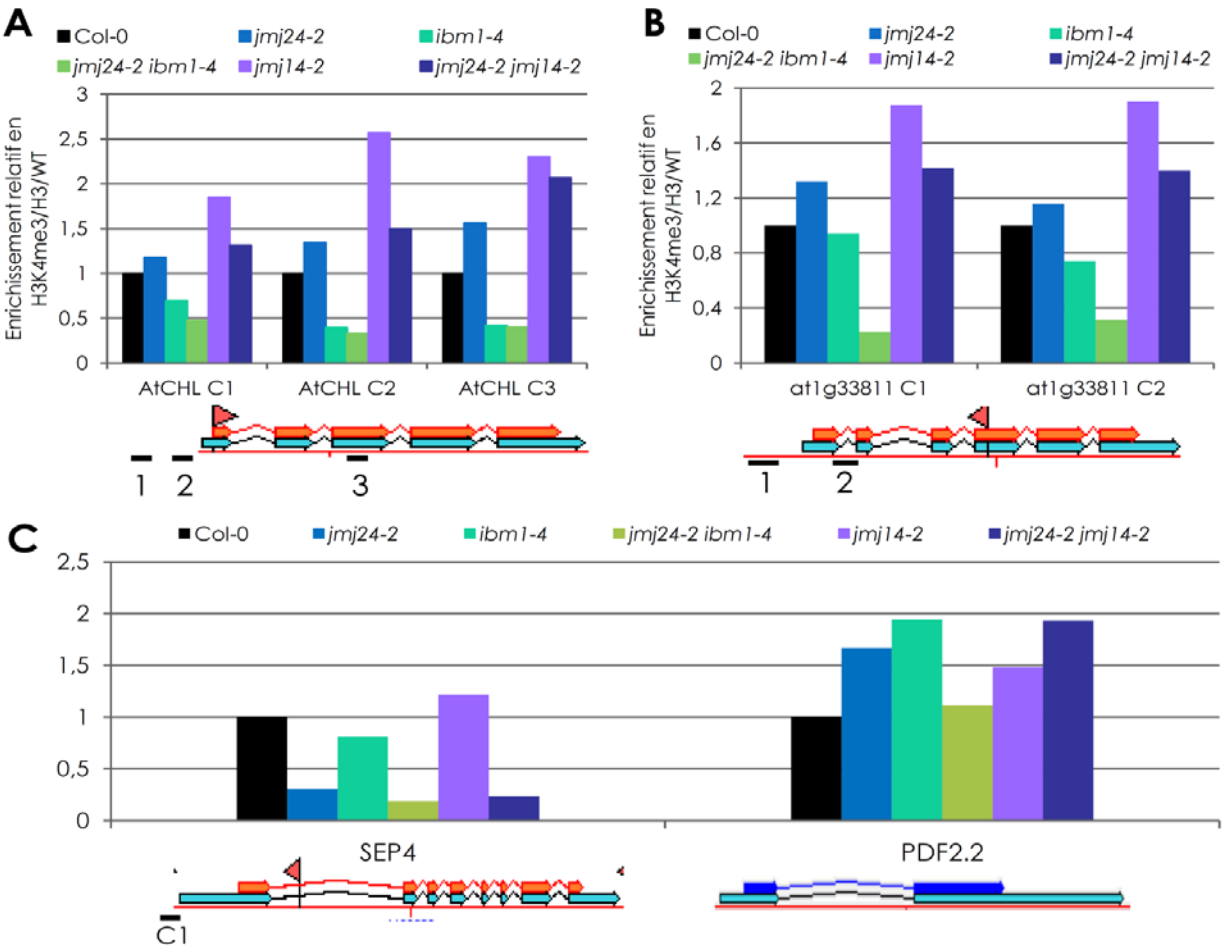


Figure 2.32 : ***Méthylation H3K4me3 de plantules mutantes jmj24-2, ibm1-4, jmj24-2ibm1-4, jmj14-1, jmj24-2jmj14-1 et sauvages Col-0 de 12j pour 4 loci***. Le niveau de méthylation H3K4me3 des gènes AtCHL (**A**), AT1G33811 (**B**), SEP4 et PDF2.2 (**C**) a été déterminée par ChIP grâce à un anticorps spécifique dirigé contre cette marque et est représenté comme l'enrichissement relatif rapporté à l'enrichissement en H3 par rapport au sauvage. La structure de chaque gènes et la position des couples d'oligonucléotides utilisés sont représentées en dessous du graphique correspondant. Les données représentent une seule répétition biologique.

(**figure 2.32a-b**). Pour *SEP4*, la diminution de H3K4me3 observée dans *jmj24-2* est retrouvée dans le double mutant *jmj24-2jmj14-1* (**figure 2.32c**).

En ce qui concerne le simple mutant *ibm1-4* et le double mutant *jmj24-2ibm1-4*, une diminution de la méthylation H3K4me3 est constatée pour l'ensemble des régions testées sauf au niveau du promoteur du gène *AT1G33811* pour *ibm1-4* et de *PDF2.2* (**figure 2.32**). Cette diminution est même accentuée par la mutation de *JMJ24* au niveau de *AT1G33811* dans le double mutant *jmj24-2ibm1-4* (enrichissement en H3K4me3 4,3 à 3,2 fois plus faible sur les régions testées, **figure 2.32b**).

La mise en perspective de la variation de ces deux marques avec les niveaux d'expression de ces quatre gènes est présentée en **figure 2.33**. Même si une corrélation évidente entre les niveaux de méthylation H3K9me2, H3K4me3 et l'expression génique est observée ponctuellement, comme par exemple pour *AtCHL* ou *SEP4* dans *ibm1-4* (**figure 2.33a et c**), dans la plupart des cas, aucune corrélation nette n'a pu être mise en évidence au niveau de ces *loci*, et particulièrement dans le mutant *jmj24-2* où une diminution de la méthylation H3K9me2 et une augmentation de la méthylation H3K4me3 sont corrélées avec une baisse de l'expression de *AtCHL*, *AT1G33811* et *PDF2.2* (**figure 2.33**). D'autres MPTs des histones sont donc impliquées dans la régulation de ces gènes.

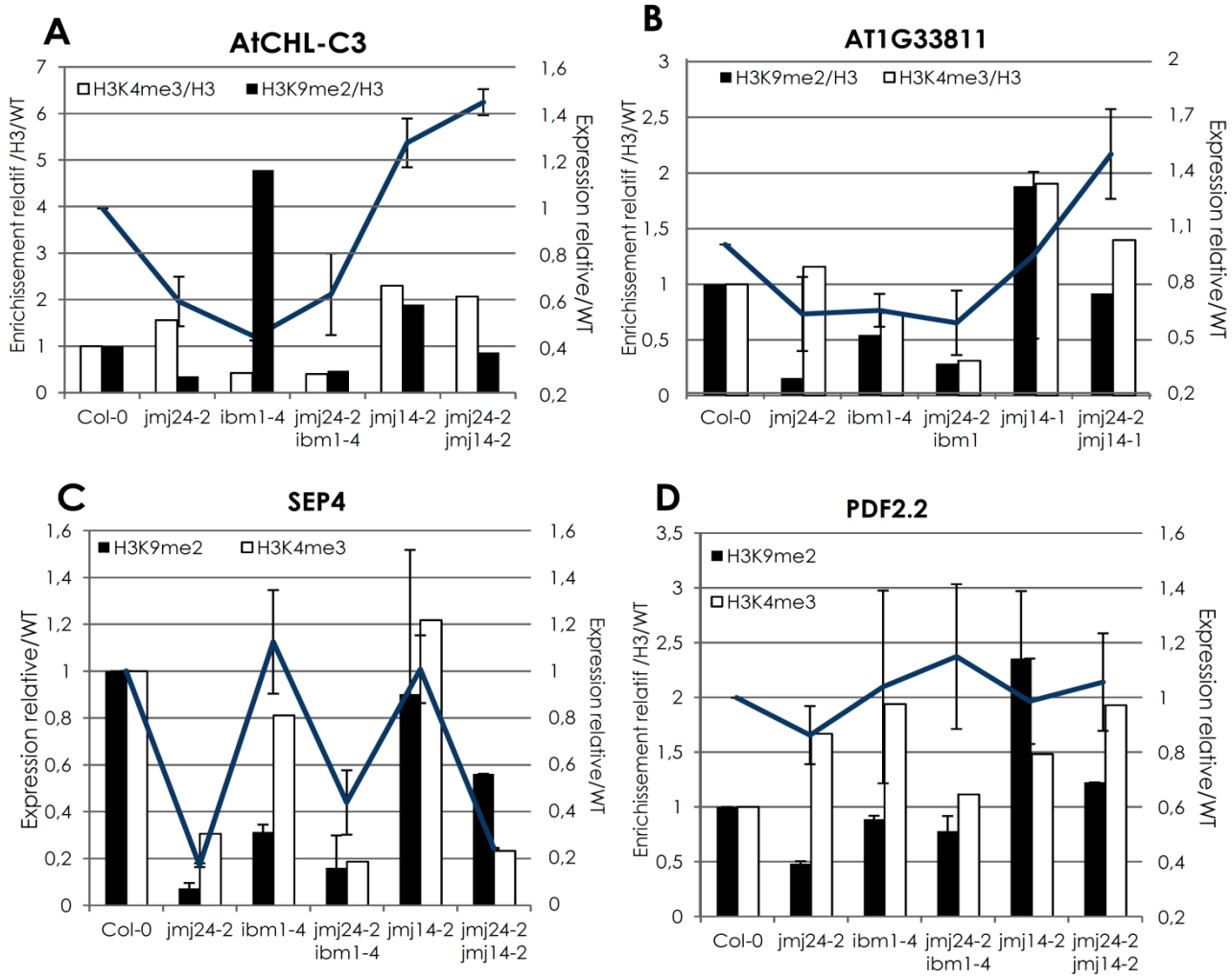


Figure 2.33 : ***Relation entre expression et niveau de méthylation H3K9me2 et H3K4me3***. Les niveaux de méthylation H3K9me2 et H3K4me3 des gènes AtCHL-C3 (**A**), AT1G33811-C1 (**B**), SEP4 (**C**) et PDF2.2 (**D**) ont été déterminée par ChIP grâce à un anticorps spécifique dirigé contre ces marques et est représentés comme l'enrichissement relatif rapporté à l'enrichissement en H3 par rapport au sauvage. Les niveaux d'expression ont été obtenus par RT-PCRq à partir d'ARN extraits de plantules de 12j et rapporté au sauvage.

De plus, suite au constat d'une expression de *JMJ24* dans le phloème en différenciation et afin de maximiser le *ratio* entre tissus dans lesquels est exprimé *JMJ24* et tissus où il ne l'est pas, nous avons décidé de changer de matériel pour les analyses suivantes et de travailler à partir de plantules de 5j. En effet contrairement aux expériences de RT-PCR, dans les expériences de ChIP le bruit de fond des cellules "voisines" peut être important par rapport au signal des cellules exprimant *JMJ24*. Les premières analyses d'expression des gènes cibles à ce stade ont montrées qu'il existe une différence de profil d'expression pour *AtCHL*, *AT1G33811*, *SEP4*, *PDF2.2* et *AT5G27410* par rapport au stade 12j (**figure 2.34**). Les résultats préliminaires d'analyse des niveaux de méthylation H3K9me2 pour *AtCHL* ressemblent à ceux obtenus à partir des plantules de

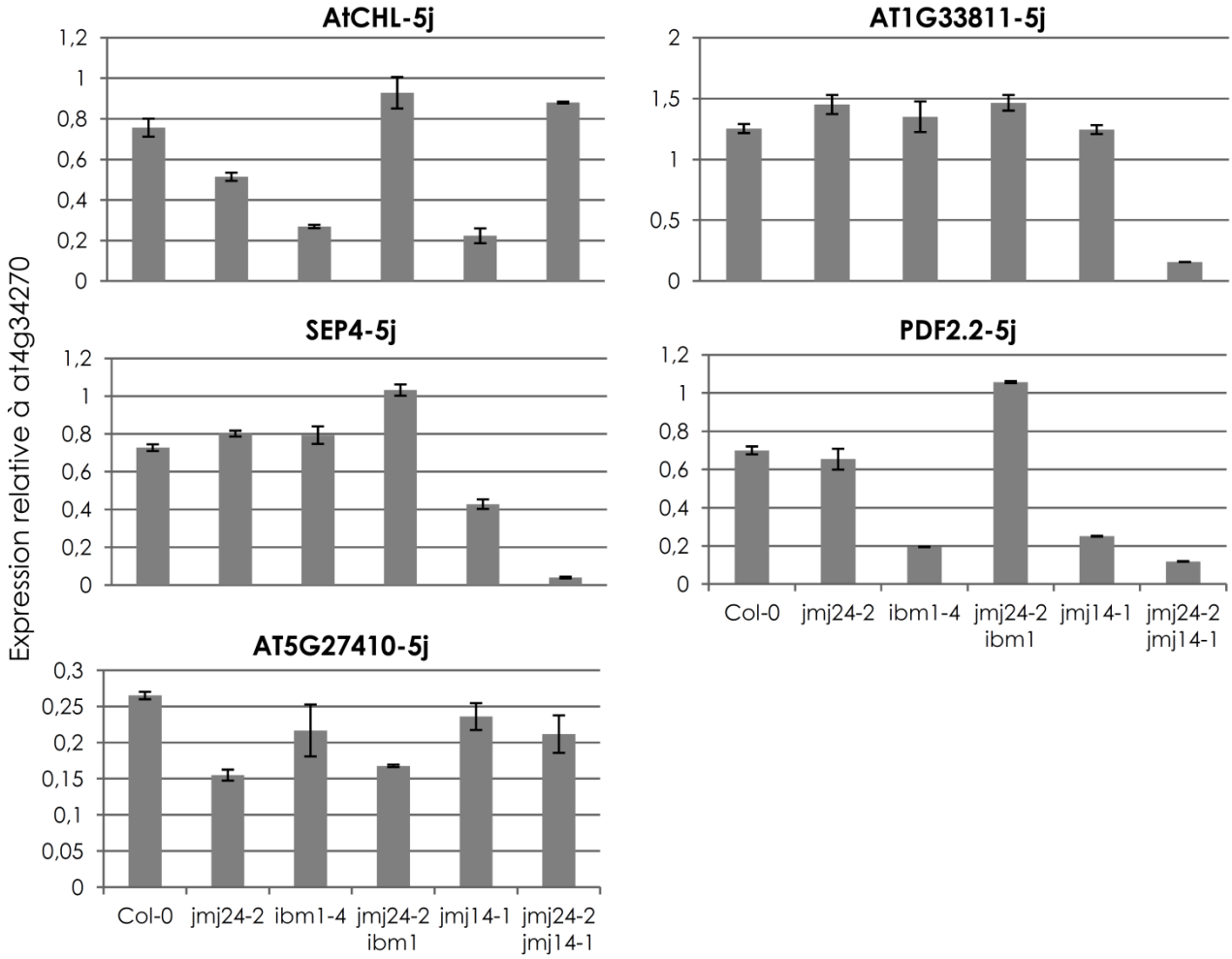


Figure 2.34 : ***Niveaux d'expression des gènes candidats au stade plantules de 5j.*** Les niveaux d'expression des gènes précédemment sélectionnés ont été obtenus par RT-PCRq à partir d'ARN extraits de plantules de 5j. Les données présentent les niveaux d'expression rapportés au sauvage pour une répétition biologique.

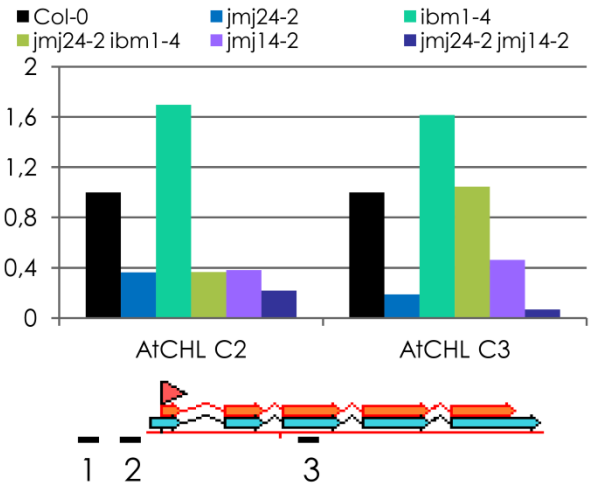


Figure 2.35 : ***Méthylation H3K9me2 de AtCHL dans des plantules mutantes jmj24-2, ibm1-4, jmj24-2ibm1-4, jmj14-1, jmj24-2jmj14-1 et sauvages Col-0 de 5j***. Le niveau de méthylation H3K9me2 a été déterminée par ChIP grâce à un anticorps spécifique dirigé contre cette marque et est représenté comme l'enrichissement relatif rapporté à l'enrichissement en H3 par rapport au sauvage. Les données représentent une seule répétition biologique.

12j, à savoir une augmentation de la méthylation H3K9me2 dans *ibm1-4* et une diminution de celle-ci dans *jmj24-2* et *jmj24-2ibm1-4*. Par contre, une diminution est aussi observée dans *jmj14-1* et *jmj24-2jmj14-1* par rapport aux plantules de 12j (**figure 2.35**). Ces résultats appuient donc le fait qu'au niveau des gènes choisis, la marque H3K9me2 n'est pas directement ciblée par JMJ24.

D. Effet de la surexpression de JMJ24

Nous avons voulu produire des lignées de surexpression constitutive pro35S:*JMJ24* (**figure 2.36**) pour étudier l'effet d'une surexpression de l'ADNc de *JMJ24* : (1) sur le développement de la plante, (2) sur les niveaux globaux de méthylation des histones et (3) sur les niveaux de méthylation spécifiques des gènes cibles identifiés précédemment. Cependant aucun transformant primaire n'a pu être identifié après sélection sur hygromycine, même à des concentrations très basses (5 µg/ml au lieu de 20 µg/ml en routine). Le problème d'une transformation non efficiente a pu être écarté car celle-ci a été réalisée en parallèle de la transformation pour la complémentation des mutants *jmj24*. L'antibiotique utilisé étant le même que pour la sélection des plantes complémentées et celle-ci ayant été effectuée également en parallèle de la sélection de plantes surexpresseures, un problème lors de la sélection a aussi pu être écarté. Quelques plantules légèrement moins sensibles que les autres après croissance sur

A

B

Figure 2.36 : ***Recherche de lignées de surexpression pro35S:JMJ24***. (**A**) La construction utilisée pour surexprimer *JMJ24* dans les sauvages Col-0 et Ws est composée du promoteur fort 35S fusionné à l'ADNc de *JMJ24*, plus une étiquette Flag-HA (Tag). L'ADN-T utilisé possède le gène de résistance à l'hygromycine (Hyg^R). (**B**) Les flèches désignent les plantes atrophiées surexprimant potentiellement *JMJ24*.

hygromycine ont néanmoins été transférées sur milieu MS sans antibiotique, puis repiquées sur terreau. Deux populations ont pu être observées : certaines se développant normalement, et d'autres restant atrophiées (**figure 2.36**). Le génotypage des plantes s'étant développées normalement a indiqué qu'aucune d'elle ne possédait la construction pro35S:*JMJ24*. Pour la deuxième population, le génotypage de quelques unes des plantes, après sacrifice de celles-ci, n'a pas donné de résultat positif non plus. La surexpression de JMJ24 ou son expression ectopique pourraient être létales expliquant ainsi l'absence de transformant observée. Afin d'outrepasser cette difficulté, deux solutions sont envisageables, soit construire des lignées de surexpression inductible, permettant ainsi d'observer l'effet d'une surproduction de JMJ24 à un stade donné choisi, soit utiliser des lignées multicopies obtenues lors de la construction des lignées de complémentation.

E. Discussion

Dans les conditions de culture du laboratoire, il a été possible de mettre en évidence que JMJ24 pouvait interagir avec deux des sept protéines JMJ testées, à savoir JMJ14 et IBM1, appartenant respectivement au groupe phylogénétique spécifique des plantes et au groupe KDM3. Cependant, ces deux groupes comprenant plusieurs protéines, il est possible qu'il existe une certaine redondance entre des protéines d'un même cluster et que la construction de triple, voir de quadruple mutants soit nécessaire afin d'observer un effet. C'est notamment le cas pour JMJ20, dont la fonction dans la

germination des graines est redondante avec celle de JMJ22 (Cho *et al.*, 2012). Ainsi, il serait aussi intéressant d'étudier l'effet de la mutation de JMJ24 dans le fond double mutant *jmj20jmj22* en construisant le triple mutant *jmj24jmj20jmj22*, et d'observer son effet sur la germination des graines.

JMJ24 appartenant au cluster KDM3, composé de déméthylases H3K9 (Yamane *et al.*, 2006; Klose *et al.*, 2006; Saze *et al.*, 2008), nous avons testé dans un premier temps son impact sur la méthylation H3K9me2 et avons montré que cette marque n'était pas la cible directe de JMJ24 au niveau des gènes testés. Ces résultats ayant été obtenus tardivement, ils seront dans un premier temps à confirmer par d'autres répétitions biologiques. Néanmoins, si la diminution des niveaux de méthylation H3K9me2, observée dans le simple mutant *jmj24-2* et le double mutant *jmj24-2ibm1-4* pour *AtCHL*, *AT1G33811* et *PDF2.2* est bien réelle (**figure 2.31**), cela permettrait de soulever l'hypothèse d'une possible implication de JMJ24 dans la méthylation H3K9me3 dans les régions géniques. En effet, il pourrait être envisageable que la présence de la méthylation H3K9me2 au niveau de ces *loci* dépende d'une déméthylation active par JMJ24 de H3K9me3 en H3K9me2. Dans cette hypothèse, la perte de fonction de *JMJ24* dans le mutant mènerait à une augmentation de la méthylation H3K9me3 aux dépens de la méthylation H3K9me2, contrebalançant ainsi les effets de la perte de fonction d'*IBM1* dans le double mutant *jmj24-4ibm1-4*, comme observé pour *AtCHL* (**figure 2.31a**). De plus, suite au problème soulevé par le faible nombre de gènes dérégulés dans *jmj24-2*, il serait également intéressant d'étudier les niveaux de ces deux MPTs des histones au niveau des séquences répétées, des éléments transposables et des séquences non codantes, cibles privilégiées de la méthylation H3K9me2.

De plus, l'expression des gènes serait sous le contrôle du ratio entre méthylation H3K4me3 et méthylation H3K27me3 (Saleh *et al.*, 2007; Vastenhouw and Schier, 2012), et non celui entre méthylation H3K4me3 et H3K9me2, des expériences de ChIP contre la marque H3K27me3 seront nécessaires en contrôle des résultats obtenus. Notamment pour les gènes enregistrant une baisse de leur expression associée à une augmentation de la méthylation H3K4me3 et une diminution de la méthylation H3K9me2, tels *AtCHL*, *AT1G33811* et *PDF2.2* dans le mutant *jmj24-2* (**figure 2.33**). Cependant, bien que ces résultats d'analyse des MPTs des histones soient préliminaires, les variations des niveaux de H3K9me2 obtenus pour *AtCHL* dans *ibm1-4*, à savoir un enrichissement plus important en H3K9me2 au niveau du corps du gène comparativement à l'extrémité 5', sont en parfaite concordance avec les données publiées par Inagaki *et al.* (2010) et permettent donc leur validation.

À première vue, la présence d'autant de gènes surexprimés (229 gènes) que sous-exprimés (416 gènes) dans le mutant *ibm1-4* peut paraître incongrue, associée à l'augmentation de la méthylation H3K9me2 et de la méthylation ADN au niveau des gènes. Cependant, les données obtenues en RNA-seq par Fan *et al.* (2012) ont montré que 2869 gènes étaient surexprimés et 2043 sous-exprimés dans *ibm1-3*, concordant avec nos résultats malgré un différentiel d'un facteur 10. Ce différentiel est explicable par la différence de techniques employées, le RNA-seq étant beaucoup plus quantitatif qu'un transcriptome obtenu par une puce à ADN. Dans cette étude, il a également été montré qu'*IBM1* était impliqué dans le contrôle de l'expression de *DCL3* et *RDR2*, composants de la voie du RdDM, et pouvait ainsi avoir un effet activateur direct et un effet répresseur indirect par cette voie sur l'expression des gènes cibles. D'autre part, nous avons pu voir que *JMJ24* et *IBM1* pouvaient co-réguler certains gènes, laissant supposer que *JMJ24* pourrait avoir un rôle répresseur sur certaines cibles indirectes de IBM1 *via* la voie du RdDM et un rôle activateur sur certaines cibles directes (**figure 2.37**)

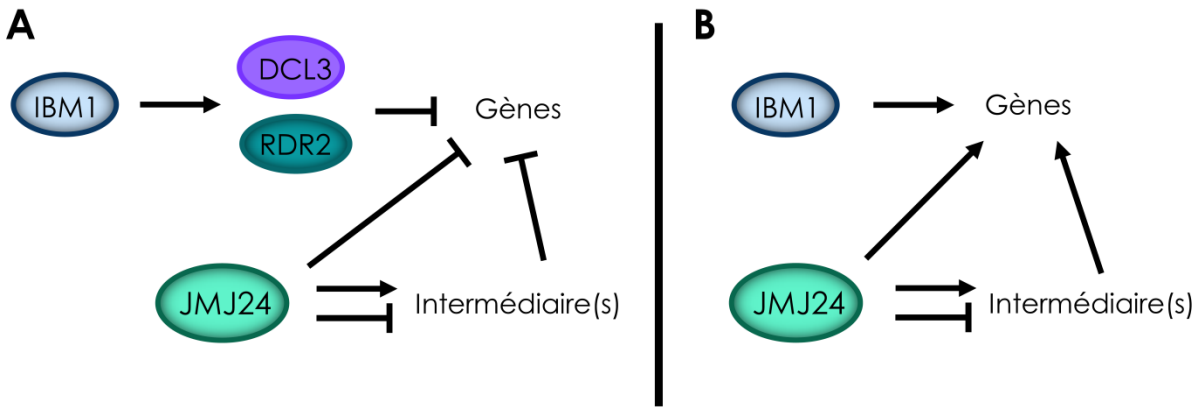


Figure 2.37 : ***Modèles hypothétiques d'interactions entre JMJ24 et IBM1***. Co-répression (**A**) et co-activation (**B**)

Néanmoins, l'analyse du domaine JmjC de JMJ24 a montrée une absence de certains résidus conservés nécessaires à la liaison des cofacteurs Fe(II) et α-KG (Lu *et al.*, 2008), laissant planer le doute sur sa capacité à être une déméthylase active. Ce cas de figure a été observé pour la protéine JARID2, dont l'absence de ces résidus la rend catalytiquement inactive. Et bien que n'ayant pas d'activité déméthylase, elle est capable de cibler des séquences ADN et d'y recruter le complexe PRC2, responsable de la méthylation H3K27me3. Cependant, l'autre cas de figure a également pu être observé. En effet, malgré un domaine JmjC le plus divergent au sein du groupe KDM3 avec tous les sites prédits de liaison aux co-facteurs, sauf un, présentant une substitution de résidu (Klose *et al.*, 2006), la protéine HR présente quand même une activité de déméthylase H3K9me1/me2 (Liu *et al.*, 2013). Pour répondre à la question quant à l'activité déméthylase de JMJ24, plusieurs tests peuvent être mis en place. La surexpression transitoire de la protéine JMJ24 par infiltration de feuilles de tabac a déjà permis l'identification des résidus cibles de plusieurs protéines JMJ, aussi bien d'*Arabidopsis* que de riz (Lu *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013). Cependant, cette méthode met en contact une quantité d'enzyme très supérieure à la disponibilité en substrat, pouvant ainsi biaiser sa spécificité d'action, il serait avisé de confirmer ce type de résultats par une étude *in vitro* de déméthylation des histones réalisée à partir de protéines JMJ recombinantes.

III. UN RÔLE POUR JMJ24 DANS LES AUTRES VOIES DE RÉPRESSION?

A. JMJ24 affecte-t-elle la méthylation ADN ?

Il a été vu en introduction que la diméthylation H3K9 et la méthylation de l'ADN étaient deux processus liés. Cette relation a pu être vérifiée dans le mutant *ibm1*, dans lequel la perte de fonction de *IBM1* entraine une méthylation ectopique du résidu H3K9 au niveau du corps des gènes, dont le locus *BONSAI*, conduisant à une hyperméthylation en contexte non-CG de l'ADN, dépendante de KYP et CMT3 et à la répression des gènes ciblés (Saze *et al.*, 2008). En parallèle de la détermination du résidu ciblé par JMJ24 par les approches de ChIP, l'analyse des niveaux de méthylation ADN a été conduite. Deux méthodes ont été utilisées : la première basée sur des enzymes de restriction sensibles à la méthylation (**figure 4.1, matériel et méthodes**) et la deuxième par séquençage après traitement de l'ADN au bisulfite.

Les séquences répétées et les éléments transposables, cibles privilégiées de la méthylation ADN, sont des *loci* préférentiels pour l'étude de cette marque. Les premières analyses après digestion par HpaII ou MspI, sensibles à la méthylation symétrique (CG et CHG) et la méthylation CHG respectivement, ont été effectuées sur *Ta3*, *AtMu1* et *FWA*. Dans le sauvage, comme dans le mutant *jmj24-1*, la présence d'un amplicon d'intensité équivalente avant et après digestion indique que les niveaux de méthylation n'ont pas été modifiés. Cependant, cette méthode étant plus qualitative que quantitative, il est possible qu'en cas de légères variations, celles-ci ne soient pas détectables par cette approche. Une autre éventualité pourrait être que les niveaux de méthylation ADN de ces séquences répétées soient déjà à leur maximum, et qu'une potentielle augmentation suite à la mutation de *JMJ24* soit impossible.

Afin d'éviter cela, nous avons cherché d'autres cibles, génique cette fois car moins sujettes à des niveaux de méthylation élevés. Parmi ces autres cibles potentielles a été testé le gène *CUP-SHAPED COTYLEDON 1* (*CUC1*) car il est impliqué dans le développement et la délimitation des organes, processus perturbés dans le mutant *jmj24-1*. Sur le gène *CUC1*, une augmentation de la méthylation CHG a pu être détectée pour certains des individus mutants *jmj24-1* testés (**figure 2.38a, plantes 3 et 9**) comparativement au sauvage Ws. Cette augmentation ponctuelle de la méthylation CHG au niveau de CUC1 pourrait traduire une potentielle propagation de la méthylation ADN à partir d'un élément transposable ou de séquences répétées à proximité. En effet, dans l'hypothèse où JMJ24 serait une déméthylase H3K9me2, il pourrait être envisageable qu'elle ait pour rôle d'empêcher la propagation, au niveau des gènes, de

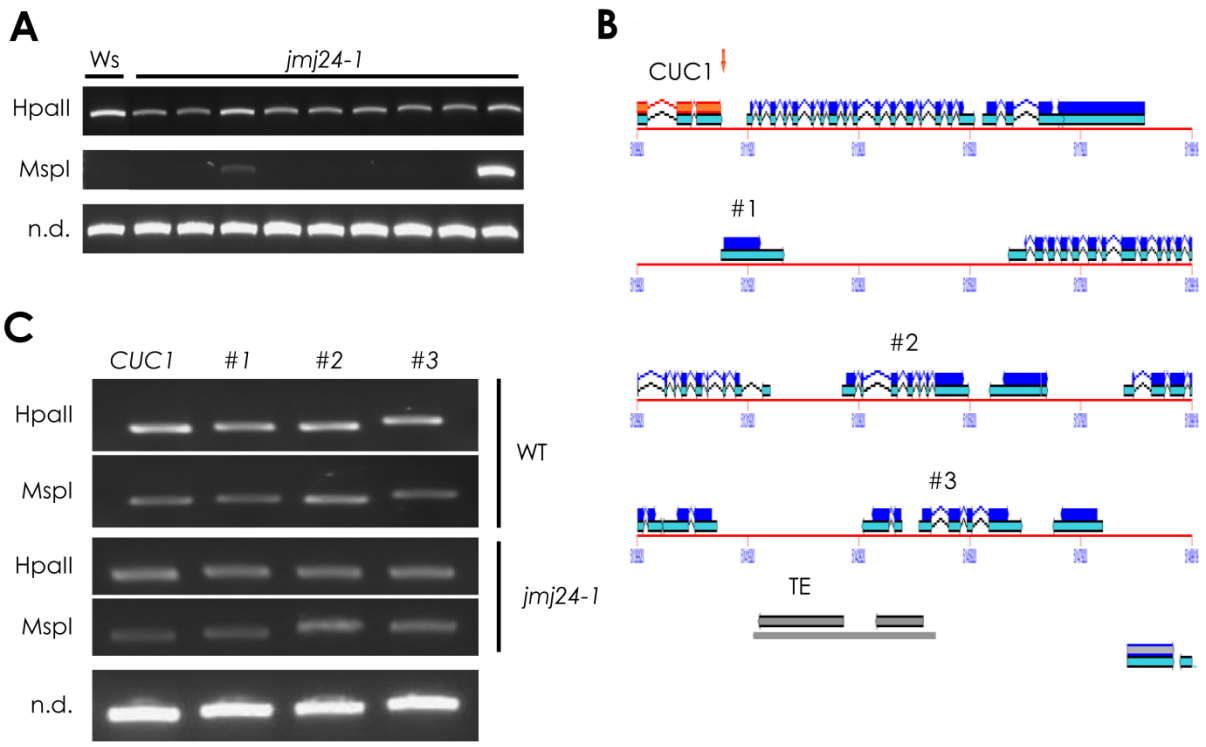


Figure 2.38 : ***Méthylation ADN de CUC1 et des gènes adjacents dans le mutant jmj24-1 et le sauvage Ws.*** Le statut de méthylation de CUC1 a été analysé suite à la digestion par des enzymes sensibles à la méthylation ADN (HpaII et MspI) et une PCR subséquente. (**A**) Le statut de méthylation de CUC1 a été déterminé à partir d'ADN extrait de feuilles de rosette. (**B**) Carte génétique de l'environnement de CUC1. #1 (AT3G15210), 2# (AT3G15240),#3 (AT3G15290) et TE (AT3G15310) (**C**) Le statut de méthylation de CUC1 et des gènes adjacents a été déterminé à partir d'ADN extrait de feuilles de rosette.

marques répressives à partir de régions d'hétérochromatine adjacentes (Meneghini *et al.*, 2003; Eichten *et al.*, 2012). En s'intéressant à l'environnement génique de *CUC1*, un élément transposable a été identifié en aval. Le niveau de méthylation de gènes se trouvant entre CUC1 et l'élément transposable a donc été analysé (**figure 2.38b-c**). La présence de bandes d'intensité égale dans *jmj24-1* et le sauvage, ainsi qu'entre chacun des gènes observés, indique que les niveaux de méthylation restent inchangés entre sauvage et mutant et qu'il n'y a donc pas eu de propagation de la méthylation ADN à partir de l'élément transposable pour l'individu observé. Il serait cependant intéressant de tester un plus grand nombre d'individus.

D'autre part, une analyse plus quantitative de la méthylation de l'ADN a été réalisée suite à une conversion par le bisulfite, au niveau cette fois de gènes cibles d'IBM1 identifiés par Miura *et al.* (2009). En effet, l'observation d'une interaction phénotypique entre JMJ24 et IBM1 au niveau des feuilles de rosette – restauration

partielle du phénotype de *ibm1-4*, indique donc une possible interaction entre ces deux protéines sur des cibles communes. Nous nous sommes donc intéressés à deux de ces gènes, AT4G35270 et AT3G16950 pour lesquels une forte augmentation des niveaux de méthylation ADN, surtout CHG, a été enregistrée. L'analyse du degré de méthylation au niveau de ces deux gènes (**figure 2.39**) a confirmé l'augmentation de la méthylation ADN observée dans *ibm1-4*, quel que soit le contexte de la cytosine méthylée (Miura *et al.*, 2009). Dans le mutant *jmj24-2*, pas ou peu de variation des niveaux de méthylation ADN ont été observés, à part une augmentation de la méthylation CG pour AT4G35270 (31 % au lieu de 23 % dans le sauvage - **figure 2.39a-b**). Dans le cas du double mutant *jmj24-2ibm1-4*, aucune variation de la méthylation ADN par rapport à *ibm1-4* n'a pu être constatée pour AT3G16950 (**figure 2.39c-d**), tandis que pour AT4G35720, l'augmentation constatée en contexte CHH dans *ibm1-4* est renforcée (27,5 % au lieu de 19,5 %) (**figure 2.39a-b**). JMJ24 ne parait donc pas avoir de rôle sur la méthylation ADN au niveau de ces deux *loci*.

Traditionnellement, l'analyse des niveaux de méthylation suite à une conversion de l'ADN par le bisulfite de sodium implique l'amplification post-traitement d'une séquence cible, son clonage dans un vecteur bactérien et le séquençage d'une vingtaine de clones ainsi obtenus afin d'obtenir des résultats statistiquement fiables (**figure 4.3**). Cependant, cette méthode étant longue et fastidieuse, nous avons cherché une alternative. Dans une étude chez le blé, la quantification des niveaux de méthylation ADN a été réalisée grâce au logiciel Mutation Surveyor (SOFTGENETICS®), à partir des chromatogrammes obtenus après séquençage direct des produits PCR avec les mêmes amorces que pour la PCR (Khan *et al.*, 2013). En parallèle de leur validation nous l'avons réalisé pour le locus *AT4G35270* avec le même produit de PCR ayant servi pour la méthode classique. Les profils obtenus étant globalement les mêmes, avec peut-être même une plus grande sensibilité avec la méthode de séquençage direct, cette approche pourra donc être utilisée pour des analyses futures (**figure 2.40**). Il faut cependant tenir compte dans la région à analyser de la zone d'imprécision en début et fin de séquence, due au séquençage *per se*.

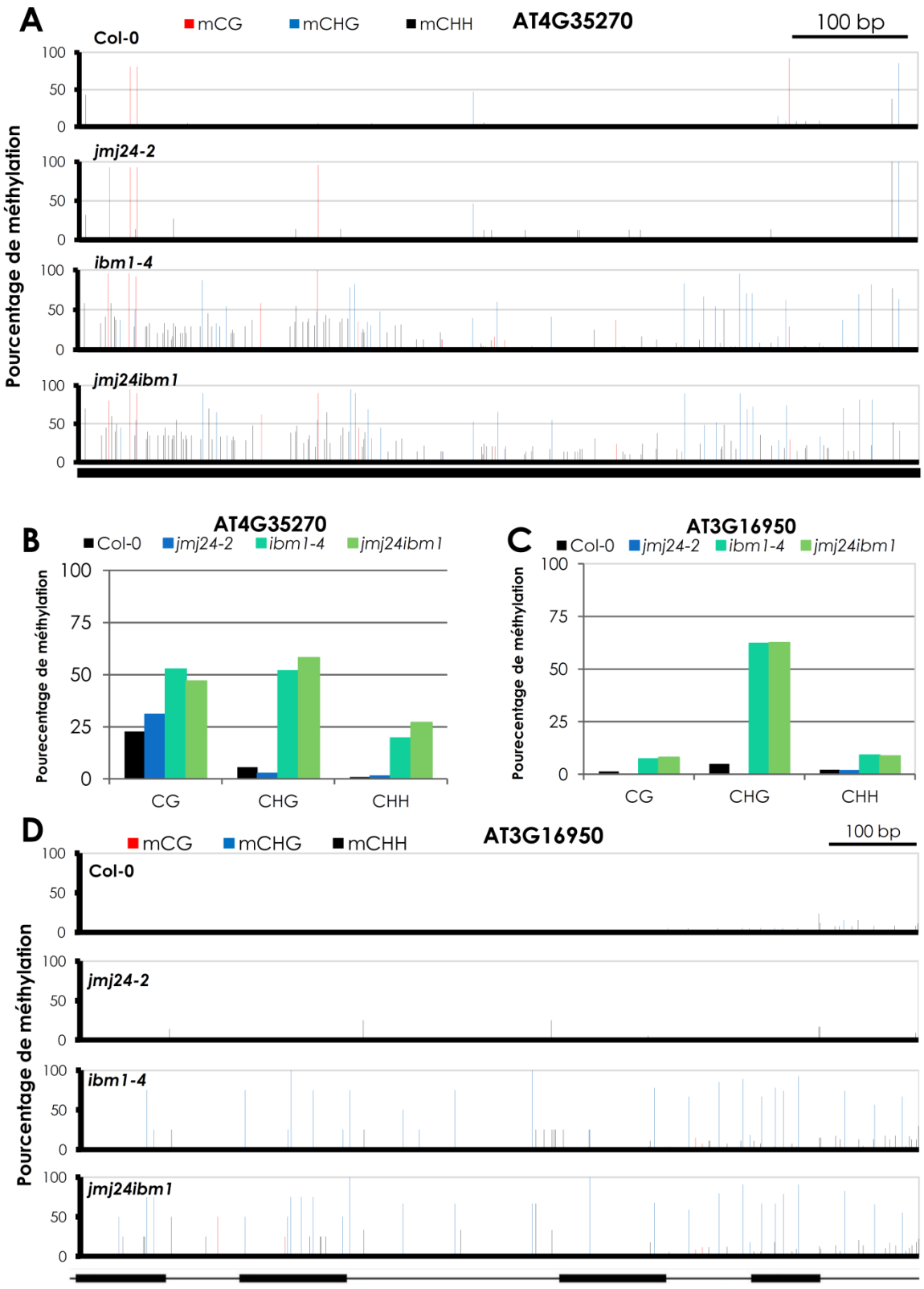


Figure 2.39 : ***Degré de méthylation ADN de 2 loci dans les mutants jmj24-2, ibm1-4, jmj24-2ibm1-4 et dans le sauvage Col-0.*** Résultats de séquençage après traitement au bisulfite pour AT4G35270 (**A**) et AT3G16950 (**D**). Pourcentage de méthylation des cytosines pour les gènes AT4G35270 (**B**) et AT3G16950 (**C**).

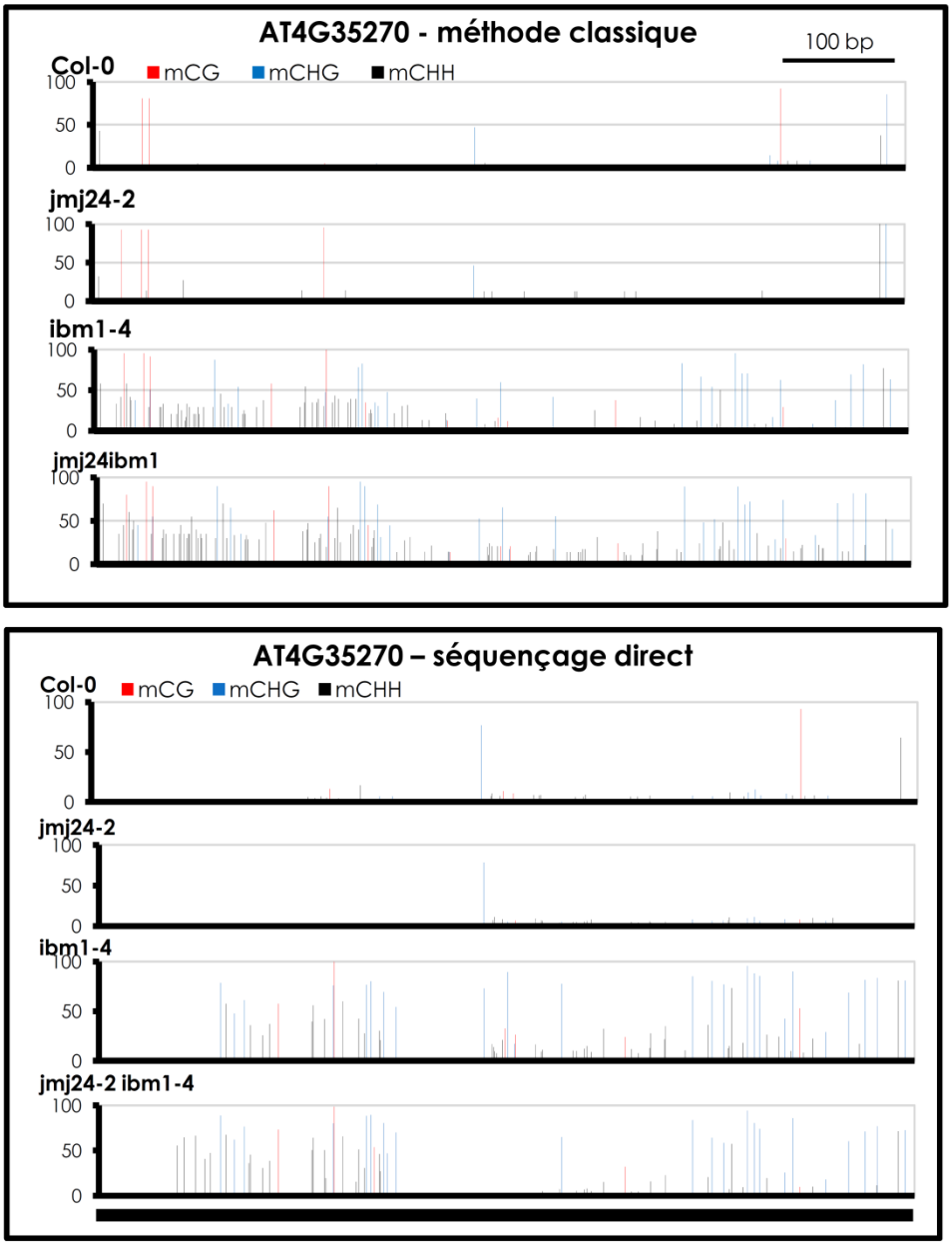


Figure 2.40 : ***Comparaison des degrés de méthylation ADN de AT4G35270.*** Par la méthode classique de clonage (**A**) et de séquençage direct (**B**).

B. JMJ24 est-elle impliquée dans l'interférence par l'ARN ?

1. Présentation des voies

Les plantes sont capables de produire des miRNA et des siRNAs, mais pas de piRNA. Les voies de biosynthèse responsables de la production de ces miRNA et siRNA partagent quelques similitudes, le point de départ pour chacune étant une molécule d'ARN double brin (dsRNA) clivée en un ou plusieurs duplexe(s) de petits ARN (sRNA) par l'une des quatres protéines dicer-like (DCL) (Baulcombe, 2004) (**figure 1.9**). La plupart des

miRNA sont produit en tant que duplexe unique, excisé par DCL1 à partir de courtes structures tige-boucle (Voinnet, 2009), bien que certains miRNA fassent partie de séries de duplexes séquentiellement clivés par DCL4 à partir de longue structure tige-boucle (Rajagopalan *et al.*, 2006). *A contrario*, les siRNA sont toujours présents sous forme de population de duplexes. Les précurseurs de ces siRNA incluent des molécules d'ARN double brin (dsRNA) résultant de l'appariement quasi parfait de transcrits présentant des séquences répétées inversées (IR), des dsRNA parfaitement complémentaires résultant de l'appariement de transcrits chevauchants et convergants (Borsani *et al.*, 2005) ou de la synthèse de molécule d'ARN double brin à partir de ARN simple brin (ssRNA) par une polymérase ARN dépendante de l'ARN (RDR). Ces molécules de dsRNA sont généralement clivées séquentiellement en siRNA de 21-, 22- et 24-nt par DCL4, DCL2, and DCL3, respectivement. La majorité des duplexes de sRNA sont méthylés à leurs extrémités par la méthyl-transférase HUA ENHANCER1(HEN1) (**figure 1.9**) afin de protéger ceux-ci de la dégradation (Li *et al.*, 2005). L'un des brins de duplexe va ensuite être chargé dans une protéine Argonaute (AGO) pour former le cœur du complexe RISC. L'identité de la protéine AGO est déterminante pour l'activité du complexe (Vaucheret, 2008). Classiquement, les miRNA et les siRNA de 21-nt, produits par DCL1 et DCL4, s'associent avec AGO1, AGO2, AGO7 ou AGO10. Une fois partie intégrante du RISC, ils entrainent la répression post-transcriptionnelle (PTGS) des ARN messagers qui leur sont quasi parfaitement complémentaires par inhibition de la traduction (Brodersen *et al.*, 2008), ou clivage (Baumberger and Baulcombe, 2005). Par contraste, les siRNA de 24-nt, produits par DCL3, s'associent avec AGO4, AGO6 ou AGO9 et déclenchent la répression transcriptionnelle des gènes (TGS) (Brosnan and Voinnet, 2011). L'enzyme DCL2 est responsable quant à elle de la production des siRNA de 22-nt, proposé comme servant de secours pour les siRNA de 21- et 24-nt (Gasciolli *et al.*, 2005), bien que dans certaines cas, DCL2 agisse de manière antagoniste avec les autres DCL (Bouché *et al.*, 2006).

2. Analyse des croisements avec des mutants *dcl2;3;4*

2.1. Description du quadruple mutant *jmj24-2dcl2dcl3dcl4*

Afin d'étudier le rôle de JMJ24 dans les voies de l'interférence ARN, le croisement entre le mutant *jmj24-2* et le triple mutant *dcl2-1dcl3-1dcl4-2t* (nommé par la suite *dcls*) a été réalisé. Si le triple mutant *dcls* ne présente qu'une légère élongation des feuilles aux stades précoces de développement, le quadruple mutant *jmj24-2dcls* quant à lui

Figure 2.41 : ***Phénotypes du quadruple mutant jmj24-2dcl2dcl3dcl4.*** Les plantes sauvages Col-0, mutantes *jmj24-2* et *dcl2dcl3dc4* (*dcl2, 3, 4*) ne présentent pas ou peu de phénotype. Les plantes quadruples mutantes *jmj24-2dcl2, 3, 4* présentent des phénotypes variés, dont la présence de feuilles de rosettes courbées (flèches blanches).

présente des phénotypes variés (**figure 2.41**) : la présence de feuilles de rosette incurvées (« curly leaf »), des retards de transition florale ainsi que des plantes de plus petite stature ont notamment pu être observés. L'apparition de phénotypes dans le quadruple mutant permet donc de conclure que JMJ24 pourrait agir de manière indépendante dans la même voie que les protéines DCL2, DCL3 et DCL4. De plus les phénotypes de ce quadruple mutant *jmj24-2dcls* ont pu être restaurés au niveau du triple mutant *dcls* par complémentation fonctionnelle avec la construction proJMJ24:ADNcJMJ24 (**figure 2.13 et 2.42**)

En parallèle de la sélection de quadruple mutants, différentes combinaisons de mutants *jmj24-2* et *dcl* ont été conservées sur la base du mécanisme de « silencing » dans lequel ces protéines sont impliquées, à savoir le double mutant *jmj24-2dcl3* (TGS) et le triple mutant *jmj24-2dcl2dcl4* (PTGS), dans l'espoir d'identifier si et dans lequel de ces deux mécanismes JMJ24 interviendrait.

2.2. JMJ24 et les DCL ont-elles des cibles communes ?

Afin de déterminer de nouveaux gènes cibles de JMJ24, et/ou de confirmer ceux obtenus par analyse transcriptomique, une seconde approche a été utilisée. L'hypothèse posée, sur la base de l'observation de l'apparition de phénotypes dans le quadruple mutant *24dcls* par rapport au triple mutant *dcls*, est que JMJ24 serait capable de palier à l'absence des DCL, et donc des sRNA, au niveau de gènes cibles communs

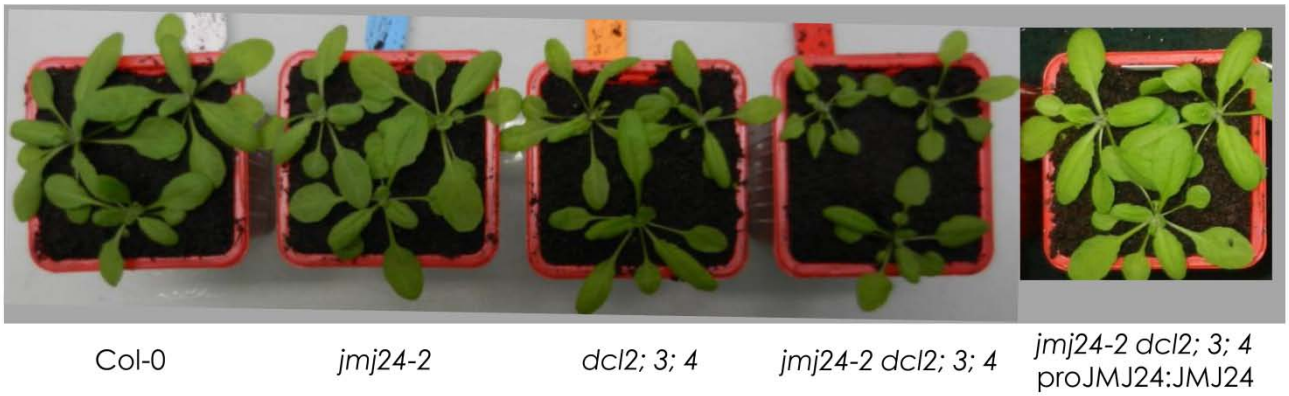


Figure 2.42 : ***Complémentation du quadruple mutant jmj24-2dcl2dcl3dcl4.*** Le phénotype des plantes *dcls* est restauré dans les plantes quadruple mutant complémentées par proJMJ:JMJ24.

en maintenant leur répression, via une action sur les marques chromatiniennes. Nous avons alors voulu identifier dans des plantes sauvages, des gènes ciblés - donc potentiellement régulés - par des sRNA et dont la répression est maintenue dans le triple mutant *dcls* malgré la diminution, voire la perte des sRNA les ciblant. Ainsi nous supposons que la perte de JMJ24 dans le quadruple mutant *jmj24-2dcls* pourrait entrainer une dérégulation de ces gènes. Il a été choisi de se focaliser préférentiellement sur DCL3 car elle est nécessaire à la production des sRNA impliqués dans la voie du RdDM et donc dans la mise en place du TGS, entrainant la méthylation de ces cibles et un remodelage de la chromatine, via notamment l'établissement de MPT répressives des histones telle H3K9me2. Si l'hypothèse d'une action conjuguée de JMJ24 et DCL3 sur des cibles communes se vérifiait et suffisait à leur répression, l'apparition des mêmes phénotypes observés dans le quadruple mutant serait attendue dans le double mutant *jmj24-2dcl3*, mais pas dans le triple mutant *jmj24-2dcl2dcl4*.

L'identification de ces nouveaux gènes cibles s'est faite par recoupement de plusieurs lots de données issus de précédentes études publiées par d'autres laboratoires. Parmi ces jeux, des données d'expression concernant le simple mutant *dcl3* (GSM261604) et le triple mutant *dcls* (Laubinger *et al.*, 2010; GSM540986, GSM540987, GSM540988) ont été utilisées. Aucun jeu de données de séquençage de sRNA n'étant disponible pour le simple mutant *dcl3*, nous avons choisi d'utiliser des données obtenues à partir du simple mutant *ibm1* (WT : GSM799868 ; *ibm1* : GSM799869). En effet dans ce mutant, *DCL3* est réprimé, permettant ainsi de lui imputer certaines variations de sRNA observées (Fan *et al.*, 2012). Après récupération des séquences individuelles de chacun

des sRNA, une analyse bioinformatique a été réalisé par V. Thareau afin d'isoler les sRNA ne ciblant qu'un seul gène (pour éviter les ambiguités de cibles), et ayant 100 % d'identité avec l'ARN synthétisé à partir de celui-ci. Après recherche dans le génome des plantes sauvage et mutante *ibm1* des gènes ciblés par les sRNA, les données d'expression disponibles pour *dcl3*, *dcls* et *jmj24-2* ont été associées pour chacun des gènes identifiés. Les gènes ont ensuite été choisis en fonction d'un ratio élevé entre sRNA présents dans le sauvage par rapport au mutant *ibm1-4* et pour lesquels les données d'expression dans le simple mutant *dcl3* ne variaient pas (**figure 2.43a**). Dans certains cas, une augmentation du nombre de sRNA est associée étrangement à une surexpression du gène concerné dans les mutants *dcl3* et *dcls*, comme ici pour ESM1 (**figure 2.43a**).

Les niveaux d'expression provenant de différentes études, le matériel végétal n'est pas homogène, nous avons donc décidé de réaliser des analyses d'expression dans les mutants *jmj24-2*, *dcls* et *jmj24-2dcls* à partir d'ARN extrait de plantules de 5j (**figure 2.43b**). Il a ainsi pu être observé pour plusieurs cibles - CAF1, SPL14, ATGCN4, ATFNR1, at4g10890 et dans une moindre mesure ORG1 – une surexpression dans le simple mutant *jmj24-2*, une sous-expression dans le triple mutant et enfin une compensation au niveau sauvage dans le quadruple mutant (**figure 2.43b**). Ces caractéristiques en font de bons gènes candidats pour l'étude de l'interaction entre JMJ24 et les DCL et pointent un rôle antagoniste de JMJ24 et des DCL au niveau de ces gènes. Pour ESM1, la surexpression a été confirmée dans le triple mutant et une plus forte a été observée dans le quadruple mutant, pointant un rôle additif de JMJ24 et DCL à ce *locus*. Pour ATABC1, la mutation de *JMJ24* n'entraine aucune variation de son expression par rapport au fond génétique sauvage (**figure 2.43b**). Ce gène pourrait alors servir de contrôle négatif de l'effet de JMJ24.

C. Discussion

Nous n'avons donc pas pu mettre en évidence une implication de *JMJ24* dans la méthylation ADN au niveau des gènes préalablement identifiés comme cibles d'*IBM1*. Il serait intéressant dans un second temps d'étudier alors les effets de la mutation de *JMJ24* sur la méthylation ADN au niveau des gènes cibles identifiés par les différentes approches utilisées dans cette étude (transcriptomique et analyse bioinformatique). L'analyse des niveaux de méthylation ADN suite au traitement au bisulfite des éléments transposables et des séquences répétées seraient également à envisager.

A

AGI	Nom	sRNA WT	sRNA *ibm1*	ratio WT/*ibm1*	*dcl3* 14d	*dcl234* 7d	*jmj24-2* 12d
At1g56170	*HAP5B*	1	0		0,011	-0,627	-0,781
At3g54540	*ATGCN4*	8	1	8,0	-0,137	-0,077	0,000
At1g20980	*SPL14*	7	1	7,0	0,058	-0,331	0,066
At4g05390	*ATRFNR1*	7	3	2,3	-0,134	-0,782	0,951
At4g10890	Protéine inconnue	13	3	4,3	-0,119	-0,526	#N/A
At4g04770	*ATABC1*	11	4	2,8	0,116	0,546	0,030
At5g53450	*ORG1*	7	9	0,8	0,073	-1,782	#N/A
At5g10960	*AtCAF1i*	9	8	1,1	-1,155	0,286	0,000
At3g14210	*ESM1*	8	37	0,2	1,131	1,364	0,000

B

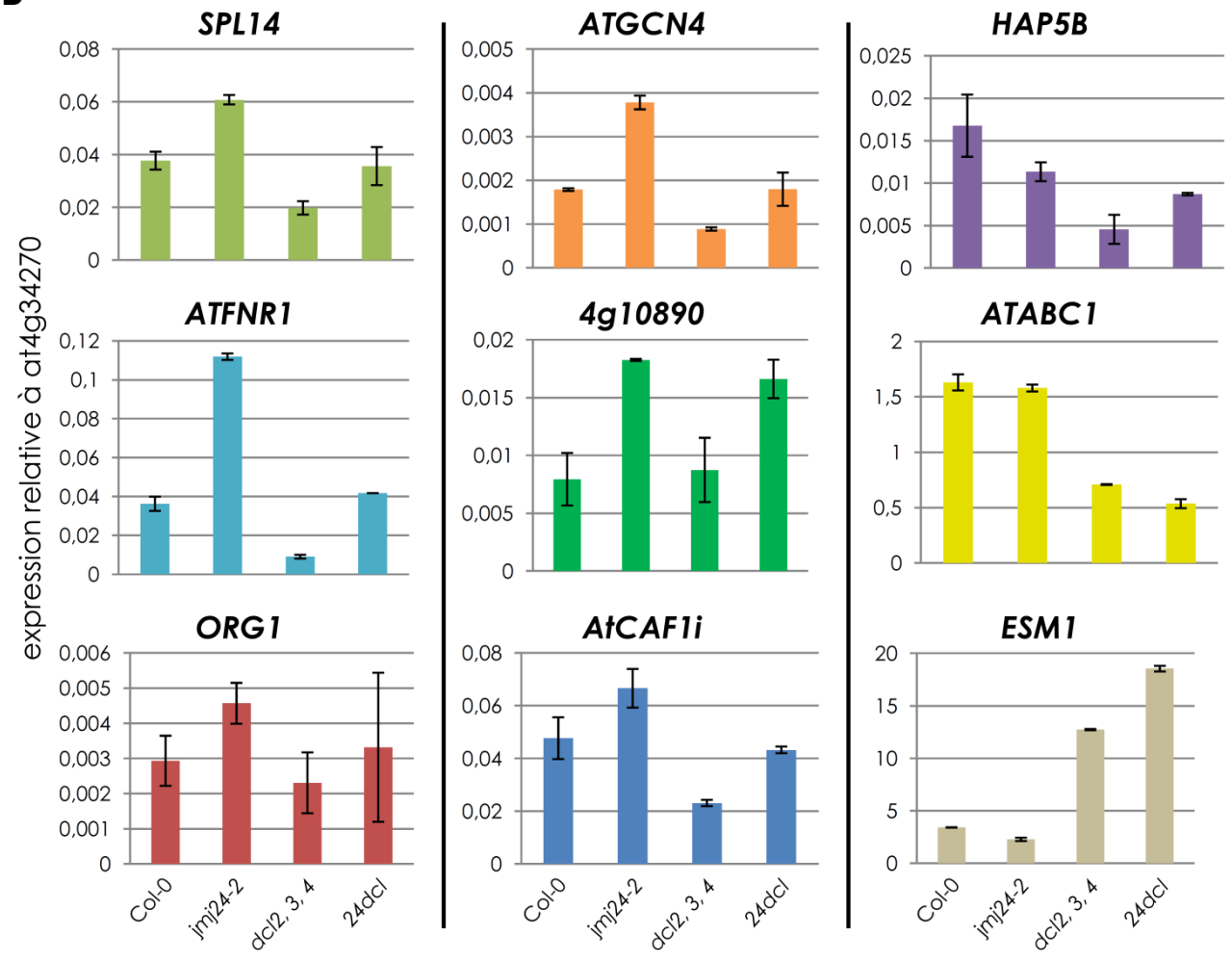


Figure 2.43 : ***Recherche de gènes candidats commun à JMJ24 et aux DCL.*** (**A**) Tableau récapitulatif des données pour les gènes sélectionnés. (**B**) Les niveaux d'expression des gènes précédemment sélectionnés ont été obtenus à partir d'ARN extrait de plantules de 5j. Les données représentent une seule répétition biologique.
dcl2,3,4 : *dcl2dcl3dcl4*. *24dcl* : *jmj24-2dcl2dcl3dcl4*. *12j*, 7j et 14j : plantules de 12j, 7j et 14j. ND #NA : données non disponibles.

De plus, nous avons pu mettre en évidence une interaction entre JMJ24 et les protéines DCL par l'étude du quadruple mutant *jmj24-2dcls*. Cependant il serait intéressant de savoir si les mutations de JMJ24 et de toutes les DCL sont nécessaires à l'apparition des phénotypes observés dans le quadruple mutant ou si seulement la combinaison de *jmj24* et d'un ou deux mutant(s) *dcl* serait suffisante. Les DCL pouvant être classées en deux groupes, celles participant au PTGS - DCL2 et DCL4 - et celle participant au TGS - DCL3, le triple mutant *jmj24-2dcl2dcl4* et le double mutant *jmj24-2dcl3* ont été produits et leur étude sera intéressante afin de déterminer à quel mécanisme de répression est associée JMJ24.

Il a été montré dans des études antérieures que des sRNA étaient toujours produits dans le triple mutant *dcls*, mais que le type de population avait changé, passant d'une majorité de sRNA de 21 nt à une majorité de sRNA de 24 nt (Molnar *et al.*, 2010). La présence de ces sRNA de 24 nt serait donc suffisante à assurer un développement quasi normal au triple mutant *dcl2dcl3dcl4*. De plus, nous avons montré que *JMJ24* est exprimé dans le phloème, par lequel s'effectue le mouvement systémique des signaux d'ARN (Yoo *et al.*, 2004). Nous nous sommes donc demandé si *JMJ24* pouvait avoir un rôle dans la mobilité des sRNA. Afin de tester cette hypothèse, des expériences de greffes (Molnar *et al.*, 2010) utilisant des plantes Col-0, *jmj24-2* et *jmj24-2dcls* exprimant la GFP (GFP) et d'autres produisant des sRNA dirigés contre la GFP seraient envisageables. Les plantes exprimant la GFP serviraient de reportrices de la répression par les sRNA. Celles-ci apparaissant vertes sous lumière ultra-violet, le signal de répression pourrait ainsi être suivi à travers la perte de fluorescence verte. Les sRNA dirigés contre la GFP seraient produits par les plantes GxGF-IR, fournies par D. Baulcombe, possédant à la fois un transgène portant la GFP (G) et un transgène constitué d'un ARN dérivé de la GFP ayant une structure en épingle à cheveux (GF-IR) (**figure 2.44**). La technique de greffe est en cours de mise au point.

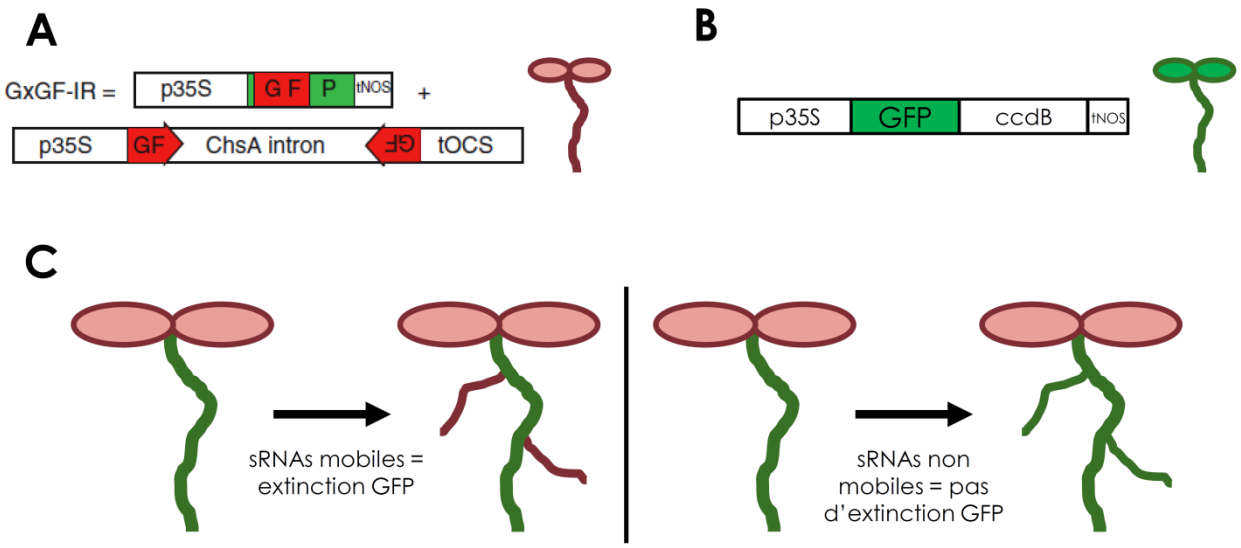


Figure 2.44 : ***Analyse de la mobilité des sRNA.*** (**A**) Schéma des transgènes G et GF-IR. Le promoteur 35S (p35S) contôle l'expression des transgènes G et GF-IR. La construction GF-IR contient un intron de la chalcone synthase A (ChsA). Les transgènes G et GF-IR contiennent le terminateur de la nopaline synthase (tNOS) ou de l'octopine synthase (tOCS) respectivement. La GFP étant réprimée, les plantes ne fluorescent donc pas en vert. (**B**) Schéma du transgène GFP. Le promoteur 35S (p35S) contrôle l'expression des transgènes GFP. Les plantes fluorescent en vert sous lumière ultra-violet. (**C**) Principe des greffes. Si la mobilité des sRNA n'est pas affectée, la GFP est donc éteinte dans la racine (gauche) après greffe du scion GxGF-IR, dans le cas contraire elle n'est pas éteinte (droite).

DISCUSSION GÉNÉRALE

Dans cette étude nous avons pu montrer que *JMJ24* est exprimé dans le phloème, tissu présent dans tous les organes de la plante, à partir duquel la protéine pourrait avoir un rôle dans la régulation des gènes. Cette localisation tissulaire est donc en cohérence avec les phénotypes pléiotropiques observés dans le mutant *jmj24-1*. Cependant, l'apparition de ces phénotypes peut être dépendante du fond génétique ou d'une expression résiduelle de *JMJ24*. L'analyse phénotypique des lignées d'introgression *jmj24-1C* et *jmj24-2W* devrait permettre la détermination des causes de l'absence de phénotypes dans les mutants *jmj24-2* et *jmj24-3*. Si l'introgression de l'allèle nul *jmj24-1*dans Col-0 n'est pas suffisante pour voir apparaître les phénotypes, cet allèle devrait néanmoins permettre l'accentuation des effets de la mutation de *JMJ24* dans cet écotype et faire du mutant *jmj24-1C* un meilleur matériel pour les analyses futures.

Les différentes approches de recherche de gènes candidats (liés au phénotype ou par analyse de données transcriptomiques) nous ont conduites à examiner l'expression de différents gènes, les MPTs des histones qui leurs sont associées pour certains, ainsi que leur degré de méthylation ADN pour d'autres. Les résultats de ces expériences ont montrées que JMJ24 ne semblait pas, au niveau des régions géniques, reconnaître la marque H3K9me2, ni être impliquée dans la méthylation ADN. Cependant, la recherche d'interaction entre *JMJ24* et des acteurs de l'interférence ARN, à travers notamment l'étude du quadruple mutant *jmj24dcls*, a pointé un rôle de *JMJ24* dans cette voie et donc potentiellement dans la régulation des éléments transposables et des séquences répétées, appuyé par le faible nombre de gènes dérégulés révélé par notre profilage transcriptionnel par puce à ADN. L'étude plus poussée de certains gènes cibles communs à *JMJ24* et aux *DCL*, ainsi que la détermination de possibles cibles hétérochromatiques devront être envisagées.

Le patron d'expression de *JMJ24* dans le phloème pose notamment le problème d'une possible dilution du signal des cellules exprimant *JMJ24* par celui des cellules « voisines » ne l'exprimant pas, dans les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine. Pour contourner ce problème et en alternative à des méthodes plus lourdes telle la méthode INTACT, nous avons commencé à changer de matériel et à utiliser pour ces analyses des plantules de 5j pour lesquelles le pourcentage de cellules de phloème par rapport au reste des cellules est supérieur à celui des plantules de 12j. Les

entre-nœuds de hampe de plantes âgées de six-huit semaines présentant les mêmes caractéristiques, son utilisation pourrait également être envisageable.

Des résultats de profilage transcriptionnel obtenus par puce tiling à partir de plantes sauvages et de plantes mutantes *jmj24,* réalisé par l'équipe de N. Chua (GSE29708) et découverts fortuitement ces derniers jours, font état d'une interaction entre *JMJ24* et *RDR2* et d'une régulation par *JMJ24* de nombreux élément transposables, séquences non codantes et gènes dans les grains de pollen matures. Ces résultats viennent renforcer notre hypothèse d'une implication de *JMJ24* dans la régulation de ces séquences. Nos résultats sont cohérents du point de vue de l'expression tissulaire, puisque nous avons montré une activité du promoteur de *JMJ24* dans le pollen en présence du premier intron.

Afin de vérifier si ce contrôle de l'expression des éléments transposables et des séquences non-codantes est retrouvé à des stades précoces, une nouvelle analyse transcriptomique avec la puce à ADN CATMAv6 couvrant ces séquences, ou la puce chromosomique spécifique du chromosome IV d'*Arabidopsis* particulièrement enrichi en ces séquences, pourrait être envisageable à partir de plantules de 5j sauvages Col-0 et mutantes *jmj24-1C*.

D'autre part, les résultats phénotypiques qui seront obtenus pour les mutants *jmj24-2dcl3* et *jmj24-2dcl2dcl4* devraient nous permettre de potentiellement déterminer la voie de répression (TGS ou PTGS) dans laquelle agit *JMJ24*. Une série de nouveaux doubles mutants construits à partir des simples mutants de la voie ainsi déterminée, nous permettront de préciser la place de *JMJ24* dans le réseau de gènes.

Les différentes expériences d'immunoprécipitation de la chromatine réalisées ne nous ont pas permis de caractériser le résidu et le degré de méthylation ciblés par JMJ24. Les résultats du chapitre II indiquent que la cible n'est pas H3K9me2 au niveau des régions géniques. Les résultats issus du chapitre III et les résultats de N. Chua lient *JMJ24* à la voie de répression de l'ARN interférence et donc à H3K9me2. Pour clarifier ces inconnues, des expériences de biochimie devront être entreprises. Nous possédons déjà au laboratoire une souche bactérienne produisant le domaine catalytique JmjC de JMJ24. L'activité de ce domaine protéique pourra être testée sur des peptides d'histones portant différentes MPTs ou sur des histones totales.

Enfin, d'après nos résultats *JMJ24* est exprimé dans le phloème et interagit avec la voie de répression par les sRNA. Il est donc légitime de poser l'hypothèse que *JMJ24* pourrait être impliqué dans la réponse aux stress et plus précisément au stress biotique.

En effet un nombre croissant d'études ont montré que des sRNA endogènes pouvaient jouer un rôle dans les réactions de défense de la plante en réponse à une agression par un pathogène (Ruiz-Ferrer & Voinnet, 2009). *JMJ24* pourrait donc participer au déclenchement de ces réactions par la voie des sRNA. À ce titre il serait intéressant de voir si les mutants *jmj24* sont plus sensibles que les plantes sauvages suite à une infection. La présence à l'Institut de Biologique des Plantes d'équipes possédant des compétences en phytopathologie permettrait une mise en place de ce type d'expérience.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. MATÉRIEL

A. Matériel végétal

1. Lignées

Les lignées utilisées sont dans les fonds génétiques Columbia-0 (Col-0) ou Wassilewskija (Ws). Les mutants issus de la collection Versailles (FLAG) possèdent un ADN-T portant les gènes de résistance à la kanamycine et au Basta, ceux de la collection SALK à la kanamycine et ceux de la collection GABI (GK) au sulfonamide.

Tableau 3.1 : ***Liste des lignées insertionnelles utilisées***

Mutant	Identifiant	Ecotype	Référence
jmj14-1	SALK_135712	Col-0	Lu *et al.,* (2010)
jmj14-2	FLAG_188F09	Ws	Yang *et al.* (2010)
jmj15-1	GK-257F10	Col-0	
jmj15-2	GK-876B01	Col-0	
jmj15-3	GK-663C11	Col-0	
jmj17-1	SALK_089978	Col-0	
jmj17-2	SALK_043417	Col-0	
jmj18-b	SALK_112433	Col-0	
jmj19-1	FLAG_226B08	Ws	
jmj19-2	SALK_025269	Col-0	
jmj20-1	SALK_024612	Ws	
jmj24-1	FLAG_497C01	Ws	
jmj24-2	SALK_021260	Col-0	
jmj24-3	GK-085C06	Col-0	
jmj25-5	FLAG_600A10	Ws	
ibm1-4	SALK_035608	Col-0	Saze *et al.* (2008)
jmj28-1	FLAG_565B03	Ws	
dcl2-1	SALK_064627	Col-0	Xie *et al.*, (2004)
dcl2-4	FLAG_451B03	Ws	Gasciolli *et al.*, (2005)
dcl3-1	SALK_005512	Col-0	Xie *et al.*, (2004)

dcl4-1	FLAG_330A04	Ws	Gasciolli *et al.*, (2005)
dcl4-2t	GABI_160G05	Col-0	Xie Z, *et al.* (2005)
dcl2-1; dcl3-1; dcl4-2t	CS16391	Col-0	
drm1	SALK_031705	Col-0	
drm2-2	SALK_150863	Col-0	
drm1-2; *drm2-2*		Col-0	
rdr2-2	SALK_059661	Col-0	
nrpd1-4	SALK_083051	Col-0	
nrpe1-12	SALK_033852	Col-0	
nrpd2a-2	SALK_046208	Col-0	

Lignée transgénique	**Ecotype**
proJMJ24:GUS	Col-0, Ws, *jmj24-2* et *jmj24-3*
proJMJ24:intron1:GUS	Col-0, Ws, *jmj24-2* et *jmj24-3*
proJMJ24:ADNcJMJ24	Col-0 et Ws
pro35S:ADNcJMJ24	Col-0 et Ws

Tableau 3.2 : ***Liste des lignées transgéniques créées***

2. Conditions de culture

2.1. Sur terreau

Les graines sont semées sur terreau traité préventivement par imprégnation avec du Prévicur ® à 1 mL.L^{-1} et Trigard ® à 0,2 g.L^{-1} afin de prévenir l'apparition de fonte des semis et le développement de sciarides. Les semis sont maintenus, soit en chambre de culture, en jours longs (photopériode de 16 h), à une température de 20°C le jour et 18°C la nuit, sous éclairage constant de 100 à 150 µE.m^{-2}.s^{-1}, avec une hygrométrie maintenue à 65 % le jour comme la nuit ; soit en serre dans les mêmes conditions de photopériode et de température, où un éclairage artificiel est employé lorsque l'éclairage naturel est inférieur à 1 kLux, et à l'inverse un ombrage est employé lorsque l'éclairage naturel est supérieur à 15 kLux. Les plantes sont repiquées en pot individuel au bout de deux semaines.

2.1. In vitro

Les graines sont stérilisées pendant 6 min dans une solution de Bayrochlor ® (1 comprimé dissous dans 40 ml d'eau milliQ est dilué 10 fois dans de l'alcool 95%) puis rincées abondamment dans l'alcool à 95%. Les graines sont ensuite semées *in vitro* sur un milieu MS 0,5X [Murashige and Skoog (Sigma) 2,2 g/L ; saccharose 1% (p/v) ; Agar 7 g/L ; pH5,8]. Après 48h à 4°C, elles sont mises à germer 10 jours en chambre de culture, en jours longs (photopériode de 16 h) ou jours courts (photopériode de 8 h), à une température de 20 °C le jour et 18°C la nuit. L'hygrométrie est maintenue à 60% le jour et 55% la nuit. Les antibiotiques *ad hoc* sont ajoutés si nécessaires : kanamycine (50 µg/ml), hygromycine (20 µg/ml).

B. Matériel bactérien

La souche bactérienne utilisée pour les clonages est la souche d'*Escherichia coli* DH5a : supE44, βlacU169, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi1, relA1 [(Hanahan, 1983 #696) ; Bethesda Research Laboratories, 1986].

La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* utilisée, GV3101 (pMP90), porte les gènes de résistance à la rifampicine et la gentamycine. Elle peut recevoir un vecteur binaire.

Les bactéries sont cultivées à 37°C sous agitation (200 rpm) dans du milieu LB liquide, ou étalées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB gélosé. Les antibiotiques *ad hoc* sont ajoutés si nécessaires : kanamycine (50 µg/ml), ampicilline (75 µg/ml), rifampicine (10 µg/ml) et gentamycine (25 µg/ml).

Milieu LB liquide : LB Broth Base (Life Technologies) 20g.L^{-1}. Autoclavage 20 minutes à 121°C.

Milieu LB solide : LB agar (Life Technologies) 32g.L^{-1}. Autoclavage 20 minutes à 121°C.

II. MÉTHODES

Clonages

1. Construction des lignées proJMJ24:GUS et proJMJ24:intron1:GUS

Pour la construction du plasmide *proJMJ24:GUS*, la région intergénique en amont du TSS du gène JMJ24 est amplifiée par PCR à partir d'une matrice d'ADN génomique (ADNg) extrait de feuilles de rosette de Col-0 avec des amorces spécifiques contenant respectivement les sites de restriction SalI et *KpnI* (5'- TCTAGAGTCGACAAAAGTGGAGAGGGCAAAGG -3', 5' – TCTAGA*GGTACC*TTTTGGTCGAGAGAAATTGCAG -3'). Le fragment de 1,97 kb est cloné dans le vecteur pGEM-T easy (Proméga) pour générer le vecteur *pGEM-T:proJMJ24a*. Après digestion du plasmide par *Sal*I et *KpnI*, le fragment *proJMJ24* est sous-cloné dans le vecteur binaire *pPR97:GUS* (Szabados *et al.*, 1995) pour obtenir le vecteur *proJMJ24:GUS*.

Pour la construction du plasmide *proJMJ24:intron1:GUS*, la même stratégie a été employée. Les oligonucléotides 5'- TCTAGAGTCGACAAAAGTGGAGAGGGCAAAGG -3', et 5' - TACGGGTACCTCTAATCACTGAATCACAAG -3' permettent d'amplifier la région de 2,48kb comprenant la région intergénique en amont de l'ATG du gène JMJ24

2. Construction de la lignée *pro35S:JMJ24*

Pour la construction des surexpresseurs de JMJ24 sous le contrôle d'un promoteur constitutif fort (*pro35S*), l'ADNc (2 790 pb) est amplifié par PCR en deux temps : un produit de transcription inverse issu d'ARN extraits de feuilles de rosette de Col-0 est utilisé pour amplifier la partie 5' de l'ADNc et une matrice d'ADN plasmidique [clone RAFL-14-53-N23 (RIKEN, Japon) est utilisée pour l'amplification de la partie 3', avec des amorces spécifiques contenant le site SpeI (5'- ATGCACTAGTATGAATGCTAATGAGCAAACTCG -3' et 5'- ACACAAGCCACGACATGCAGG -3') et (5'- GAGAGAGAATCATTTCTTGCC -3'et 5'- ATGCAACTAGTAGTGCAGCTGTTTTGCTG-3') respectivement. Les fragments de 1,5 kb et 2,3 kb sont clonés dans le vecteur pGEM-T Easy (Proméga) pour générer les vecteurs *pGEM-T:5'ADNcJMJ24* et *pGEM-T:3'ADNcJMJ24*. Après digestion des vecteur par *Spe*I et MfeI, les fragments *5'ADNcJMJ24* et *3'ADNcJMJ24* sont sous-clonés dans le vecteur binaire pFA121, dérivé de la série pPZP (Hajdukiewicz *et al.*, 1994), par ligation tripartite, pour créer le vecteur *35S:ADNcJMJ24.*

3. Construction de la lignée proJMJ24:ADNcJMJ24

Pour la construction de complémentation de *jmj24* sous le contrôle du promoteur endogène (*proJMJ24*), l'ADN génomique extrait de feuilles de rosette de Col-0 est amplifié par PCR avec des amorces spécifiques contenant respectivement les sites *KpnI* et SalI pour le promoteur (5'- TCTAGA*GGTACC*AAAAGTGGAGAGGGCAAAGG -3' et 5'-ATCGGTCGACTCTAATCACTGAATCACAAG -3'). Le fragment de 1,97 kb est cloné dans le vecteur pGEM-T easy pour générer le vecteur *pGEM-T:proJMJ24b*. Les vecteurs *pGEM-T:5'ADNcJMJ24* et *pGEM-T:3'ADNcJMJ24* précédemment décrits sont à nouveau digérés par SpeI et MfeI et les fragments *5'ADNcJMJ24* et *3'ADNcJMJ24* sont sous-clonés dans le vecteur binaire pFA1300, dérivé de la série pPZP (Hajdukiewicz *et al.*, 1994), par ligation tripartite, pour créer le vecteur *pFA1300:ADNcJMJ24.* Après digestion du vecteur *pGEM-T:proJMJ24* par *KpnI* et *SalI*, le fragment *proJMJ24* est sous-cloné dans le vecteur *pFA1300:ADNcJMJ24* pour générer le vecteur proJMJ24:ADNcJMJ24.

4. Transformation des bactéries

Entre 2 et 3 µl de produit de ligation non dessalé sont mis en présence de 40 µl de bactéries électro-compétentes pendant 5 min dans la glace. Ce mélange est ensuite placé dans une cuve à électroporation préalablement refroidie, puis électroporé à 1,8 kV (Micropulser™, Bio-Rad). 1 ml de LB liquide est immédiatement ajouté dans la cuve après impulsion électrique et les bactéries sont mises à incuber 1h à 37°C (*E. coli*) ou 28°C (*A. tumefaciens*), avant d'être étalées sur du milieu LB gélosé additionné de l'antibiotique adéquat. Les boîtes sont incubées 12 h à 37°C (*E. coli*) ou 36h à 28°C (*A. tumefaciens*).

5. Transformation d'Arabidopsis

Avant transformation dans *Agrobacterium tumefaciens*, les constructions sont vérifiées par séquençage. Les constructions sont introduites dans *A. tumefaciens* (souche GV3101) par électroporation. La transformation des plantes est effectuée par la méthode de trempage de boutons floraux « floral dipping » (Clough and Bent, 1998). Des plantes transgéniques sont obtenues par transformation de plantes Col-0, Ws, *jmj24-2*, *jmj24-3* et *ibm1-4*. Les transformants sont sélectionnés *in vitro* sur milieux sélectifs contenant de la kanamycine (50mg.mL^{-1}) ou de l'hygromycine (20mg.mL^{-1}) en fonction de la résistance conférée par le vecteur binaire. Les lignées mono-insertionnelles présentant 100% de résistants en T3 sont sélectionnées pour la suite des analyses.

B. Génotypage par PCR des lignées d'insertion ADN-T

1. Extraction des ADNg

Cette extraction est rapide et permet de réaliser des anlyses simples de génotypage. Les échantillons congelés sont broyés 30 sec à 30 Hz à l'aide d'un broyeur à billes (Retch MM300), puis homogénéisés et l'ADNg est extrait dans 400 µL de tampon d'extraction Edwards (200 mM de Tris à pH 8; 250 mM de NaCl; 25 mM d'EDTA et 0,5 % de SDS) pendant 5 min. Après 15 min de centrifugation à 3500 *g* à température ambiante, 300 µL de surnageant sont mélangés à 300 µL d'isopropanol afin de précipiter l'ADN, et centrifugés 30 min à 3500 *g*. Les culots sont ensuite séchés à 37°C et resuspendus dans 200 µL de Tris 10mM pH=7.6.

2. PCR

Les séquences des amorces ainsi que les conditions de PCR sont données en **annexe 2**. Les PCR sont réalisées avec 5 µl d'ADN. Les produits d'amplification sont analysés sur gel d'agarose (1 à 2 %).

C. Phénotypage

1. Mesure de la longueur racinaire

Les graines stérilisées sont semées sur du milieu MS ½ et les boites sont placées verticalement en conditions de JL et JC. La croissance racinaire d'une vingtaine de plantules est suivie à 5, 7 et 9 jours. Les plantules sont photographiées et la longueur des racines est mesurée par ImageJ (U.S. National Institute of Health). Deux lots de graines indépendants sont analysés par génotype. La moyenne des moyennes de chaque lot est calculée.

2. Mesure de la surface des cotylédons

Les graines stérilisées sont semées sur du milieu MS ½. La croissance des cotylédons d'une vingtaine de plantules est suivie à 5, 7 et 9 jours. Les cotylédons sont coupés au niveau du pétiole, mis à plat et photographiés. L'aire est mesurée par ImageJ (U.S. National Institute of Health). Deux lots de graines indépendants sont analysés par génotype. La moyenne des moyennes de chaque lot est calculée.

3. Nombre d'organes floraux

Le comptage est effectué sur des plantes semées directement sur terreau en pot individuel. Les fleurs sont prélevées aléatoirement au niveau de la hampe primaire et des hampes secondaires. Le nombre d'organes floraux est quantifié visuellement à partir d'une centaine de fleurs par génotype, observées sous un stéréomicroscope SVII ZEISS. Les images sont acquises avec une caméra couleur CCD Sony.

4. Cytométrie en flux

Un morceau de feuille de rosette est prélevé et hachés à l'aide d'une lame de rasoir dans 1 mL de tampon CyStain® UV ploidy (Partec, Münster, Allemagne). Le produit du hachage est ensuite filtré sur une maille en nylon de 100µm et analysé à l'aide d'un cytomètre en flux CyFlow® Space (Partec, Münster, Allemagne) sur la plateforme de Cytologie et Imagerie Végétale de l'Institut Jean-Pierre Bourgoin (Versailles).

5. Microscopie électronique à balayage

Les observations des méristèmes floraux et d'inflorescence ont été réalisées par microscopie électronique à balayage (MEB). Les échantillons sont fixés, sans traitement préalable, par du scotch double face à la platine du MEB (Hirox SH-1500) et sont refroidis à -30°C par effet Peltier.

D. Analyses de l'expression génique

1. Extraction des ARNs

La partie aérienne de 15 plantules de 12 jours ou une vingtaine de plantules de 5 jours sont prélevées dans des tubes de 2 mL, dans lesquels est ajoutée une bille d'acier de 10 mm de diamètre, et immédiatement congelés dans l'azote liquide pour bloquer toute réaction métabolique. Les plantules sont ensuite broyées à froid à l'aide d'un broyeur à billes (30 sec à 30 Hz, Retsh MM300). Les ARNs sont extraits et purifiés à l'aide du kit Macherey-Nagel RNA Plant® selon les instructions du fabricant. Les ARNs sont finalement élués dans 40 µL d'eau stérile et dosés par spectrophotométrie à 260 nm (NanoDrop, Thermo Scientific). De plus l'intégrité des ARNs est vérifiée par dépôt sur gel d'agarose (1 %).

2. RT-PCR

La réaction de rétro-transcription des ARNm en ADNc est réalisée à partir de 600 ng d'ARN de chaque échantillon. Des oligo dT sont tout d'abord hybridés à la queue polydA des ARNm à 65°C pendant dix minutes (1 µL d'Oligo dT Proméga, 500 µg/mL). L'hybridation est arrêtée en plaçant les échantillons dans la glace. La transcription inverse est ensuite réalisée pendant 55 min à 42°C en présence d'1 U d'enzyme de RT et des réactifs du kit ImpromII® (Proméga). Les PCR sont réalisées sur environ 50 ng d'ADNc. Les produits d'amplification sont analysés sur gel d'agarose (1,5 %), par dépôt d'un même volume de chaque produit PCR. Le niveau d'expression de chaque gène est visuellement comparé à celui d'un gène considéré comme s'exprimant de manière constitutive, mesuré dans le même échantillon. Ce gène est celui de l'Actine 2 (ACT2).

3. RT-PCR quantitative (RT-PCRq)

La réaction de rétro-transcription est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment décrit. La réaction de PCR a été réalisée sur 5 µL d'ADNc dilués à 10 ng.µL^{-1} dans de l'eau stérile, avec des amorces (**annexe 3**) permettant d'amplifier de manière spécifique des fragments de taille comprise entre 90 et 200 pb. En plus de la matrice d'ADNc et des amorces, le mélange contient le réactif SYBR® Green I Master (Roche) composé en particulier du Sybr Green I, agent intercalant fluorescent spécifique de l'ADN double brin. L'appareil utilisé est un thermocycleur Roche Light Cycler 480 (RocheDiagnostics, Indianapolis, EU). La réaction de PCRq a été réalisée en *duplicata* techniques. Le gène *at4g34270* a été utilisé comme gène de référence pour normaliser les données car son niveau d'expression est du même ordre de grandeur que celui des gènes analysés et ne présente pas de variation dans nos conditions expérimentales (Czechowski *et al.*, 2005). Chaque expérience a été réalisée au minimum sur deux échantillons biologiques indépendants. Les barres d'erreur présentées sur les graphiques correspondent à l'écart type.

4. Analyse du transcriptome d'Arabidopsis

L'analyse du transcriptome de plantes simples mutantes *jmj24-2* et *ibm1-4* et de plantes doubles mutantes *jmj24-2 ibm1-4* par rapport au sauvage Col-0 est réalisée à l'aide d'une Puce Affymetrix® ATH1 contenant environ 22 500 gènes. Seule la partie aérienne de plantules de 12 jours est utilisée. L'analyse trancriptomique est réalisée par la plateforme de transcriptomique de l'URGV (Evry, France, http://www-

urgv.versailles.inra.fr/microarray/index.htm) suivant les protocoles standards Affymetrix. Par génotype, 2 échantillons biologiques indépendants sont générés. Des RT-PCRq sur ces mêmes échantillons sont réalisées afin de confirmer les résultats obtenues avec les puces à ADN.

5. Localisation tissulaire de l'expression du gène *JMJ24* par coloration GUS

En présence de son substrat (5-bromo-4-chloro-3-indoyl glucuronide ou X-Gluc), la β-glucuronidase (GUS) produit un précipité bleu permettant sa localisation en microscopie. La coloration GUS est effectuée comme décrit par Bertrand *et al.*, 2003. Le matériel (plantules, feuilles de rosette, tige et inflorescences) est prélevé sur 3 lignées indépendantes *pro:JMJ24:GUS et pro:JMJ24:intron1:GUS*. Les échantillons sont fixés 20 min dans l'acétone 90%, rincés dans du tampon de coloration sans X-Gluc (0,5 mM tampon $NaHPO_4$ pH 7,2 ; 5 mM ferrocyanide de potassium ; 5 mM ferricyanide de potassium), puis transférés dans ce même tampon additionné de de X-Gluc à 2 mM (Sigma-Aldrich). Pour infiltrer le substrat dans les tissus, les échantillons sont placés sous vide 30 min puis sont incubés à 37°C à l'obscurité. La durée de coloration varie en fonction des échantillons (entre 30 min et O/N). La réaction est arrêtée en remplaçant le tampon de coloration par un bain d'éthanol à 25%. Enfin, les tissus sont déshydratés par des bains successifs de 20 min dans de l'éthanol en concentrations croissantes de 35% à 50%. Pour fixer la coloration GUS, les échantillons sont incubés dans une solution d'acide acétique/éthanol 100% (1 : 3 ; vol : vol). Les tissus sont enfin éclaircis dans une solution d'hydrate de chloral (80 g d'hydrate de chloral, 30 mL de glycérol, 10 mL d'eau) puis observés à l'aide du macroscope AZ100 Nikon (Shinjuku, Japon) relié à une caméra couleur DsRi1 (Nikon) et équipé du logiciel de prises de vues Nis Element (Nikon).

E. Analyse de la méthylation de l'ADN

1. Digestion par HpaII/MspI

1.1 Extraction de l'ADN à l'urée

Les échantillons congelés sont broyés 30 sec à 30 Hz à l'aide d'un broyeur à billes (Retch MM300), puis homogénéisés et extraits dans un 1 mL de tampon d'extraction "Urée" (7 M d'urée; 50mM de Tris à pH 8; 20 mM d'EDTA; 300 µM de NaCl; 1 % de SDS) pendant 20 min à 55°C jusqu'à complète lyse des cellules. Les ADNs sont extraits au

phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25 : 24 : 1), suivi d'une précipitation à l'isopropanol. Après rinçage des culots à l'éthanol 70%, les ADNs sont finalement élués dans 40 µl de TE, auxquels sont ajoutés de la RNAse A (100 µg/ml).

1.2 Digestion des ADNs

1 µg d'ADN est digéré sur la nuit à 37°C avec 6 U d'enzymes HpaII ou MspI (Promega), sensibles à la méthylation CG et CHG et à la méthylation CHG seule respectivement. Les enzymes ont ensuite été inactivées 20 min à 65°C pour HpaII et à 80°C pour MspI. Un contrôle non digéré est réalisé en parallèle sans ajout d'enzyme. Les produits de digestion sont ensuite analysés sur gel d'agarose (1 %), par dépôt d'un même volume de chaque amplification. Le niveau de méthylation de chaque gène est visuellement comparé à celui du contrôle sans digestion (**figure 4.1**).

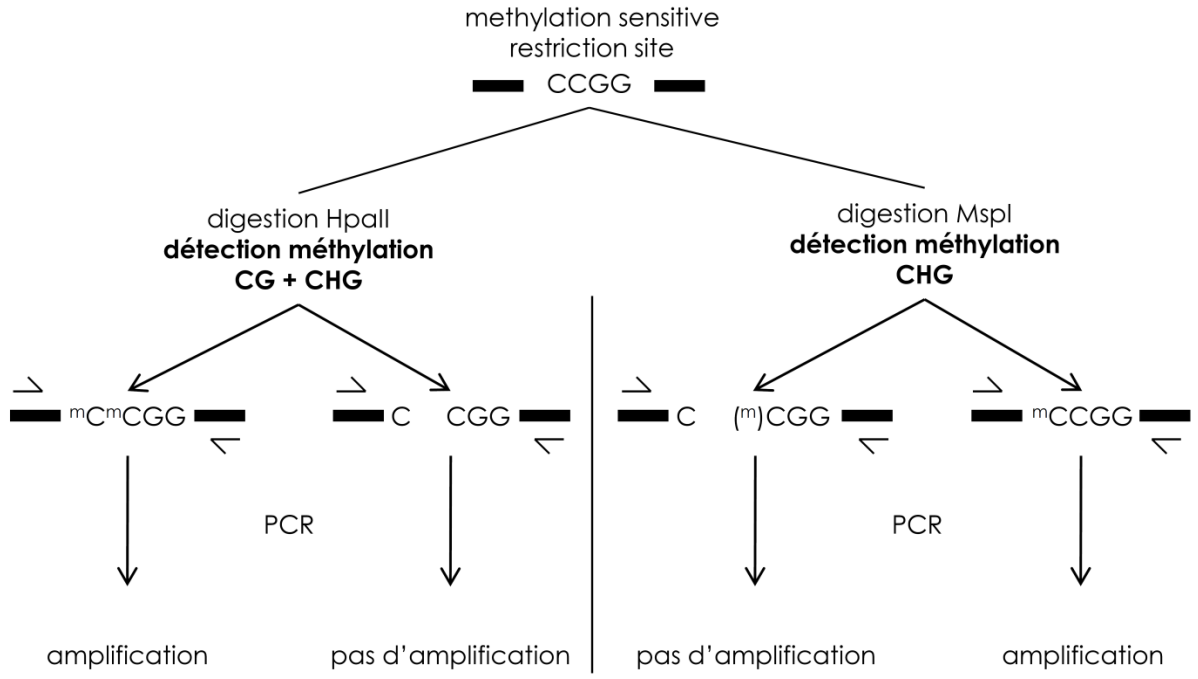


Figure 4.1 : ***Principe de la digestion par HpaII/MspI.*** HpaII et MspI reconnaissent le même site de restriction mais leur spécificité de coupure diffère en fonction du contexte de méthylation ADN présent au niveau de celui-ci.

2. Séquençage après conversion au bisulfite

2.1 Extraction de l'ADN au CTAB

Les échantillons congelés sont broyés 30 sec à 30 Hz à l'aide d'un broyeur à billes (Retch MM300), puis homogénéisés et extraits dans un 1 mL de tampon d'extraction "CTAB" (2 % CTAB; 100mM de Tris à pH 8; 20 mM d'EDTA; 1,4 M de NaCl; 2 % de PVP40 et 0,2 % de β-mercaptoethanol) pendant 2 h à 65°C. Une extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25 : 24 : 1), suivie d'une précipitation à l'isopropanol, permet une première purification de l'ADN, qui est resuspendu dans 100 µl de TE. Les ADNs sont ensuite traités à la RNAse A (100 µg/ml, incubés 1 h à 37°C), puis à la protéinase K (100 µg/ml, incubés 3h à 50°C). Une nouvelle extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25 : 24 : 1), suivie d'uneprécipitation à l'éthanol permet de récupérer l'ADN qui est resuspendu dans 32 µl de TE. Les ADNs sont finalement dosés par spectrophotométrie à 260 nm (NanoDrop, Thermo Scientific).

2.2 Conversion au bisulfite et analyse

800 ng d'ADN sont traités au bisulfite avec le kit EpiTect Bisulfite Kits (Quiagen). Les PCR sont réalisées à partir de 140 ng d'ADN. Les séquences des amorces ainsi que les conditions de PCR sont décrites en **annexe 4**. Le produit de PCR est alors extrait sur gel avec le kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). Dans un premier temps, les produits de PCR ont été clonés dans le vecteur pGEM-T easy (Promega). Des bactéries DH5α ont ensuite été transformées par électroporation avec 2 µl de produit de

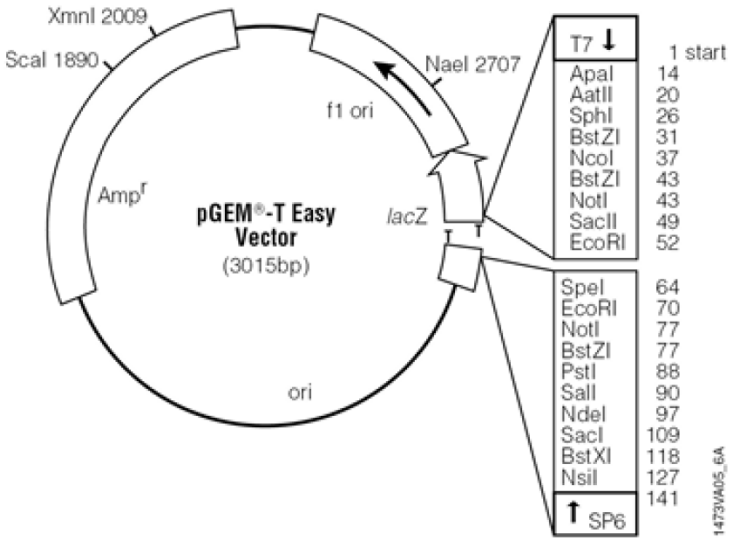


Figure 4.2 : ***Carte génétique du vecteur pGEM®-T Easy.***

ligation, puis étalées sur des boîtes LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline. La présence de l'insert est vérifiée par PCR avec les mêmes amorces utilisées pour l'amplification initiale. Après vérification, les plasmides ont été purifiés avec le kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega) selon les instructions du fabriquant et séquencés avec les amorces SP6 et T7 (**figure 4.2**). Les séquences de 20 colonies sont analysées avec le logiciel CyMATE (Hetzl *et al.*, 2007). Le pourcentage de méthylation pour chaque cytosine de la séquence est calculé pour le brin sens comme le ratio entre le nombre de clones dans lesquels le C est conservé et le nombre de clones total, c'est-à-dire qui présentent un C ou un U. Les pourcentages de chaque cytosine du brin sens sont ensuite analysés selon le contexte CG, CHG et CHH (**figure 4.3**).

Dans un second temps, le séquençage direct des produits PCR est réalisé en utilisant les mêmes amorces que pour la PCR. La quantification de la méthylation est analysée à partir des chromatogrammes grâce au logiciel Mutation Surveyor (SOFTGENETICS®) en gardant les paramètres par défaut. Cette analyse est réalisée sur les mêmes produits d'amplification utilisés précédemment pour l'analyse par clonage (**figure 4.3**).

F. Analyse des modifications d'histone

1. Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

1.1 Pontage de la chromatine

La partie aérienne de plantules de 12 jours ou les plantules de 5 jours subissent une étape de pontage chimique par une infiltration sous vide de 15 min dans une solution de formaldéhyde à 1 %. La fixation est stoppée par ajout de glycine à une concentration finale de 125 mM. Les échantillons sont à nouveau placés sous vide pendant 5 minutes puis rincés, séchés et congelés dans l'azote liquide.

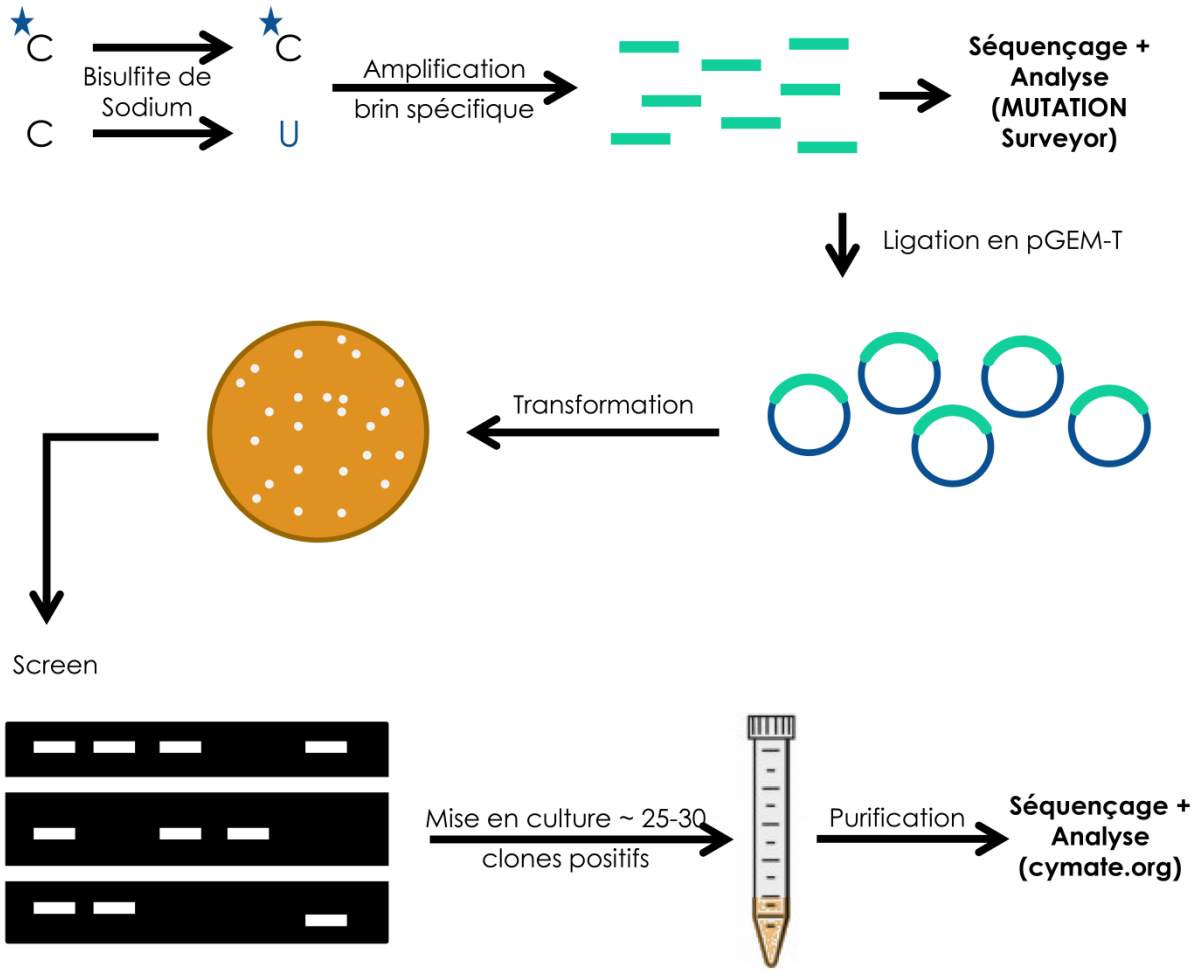


Figure 4.3 : ***Étapes de l'analyse de la méthylation de l'ADN après traitement au bisulfite.***

1.2 Extraction de la chromatine

Les expériences de ChIP sont effectuées d'après Bowler *et al.*, 2004 (**figure 4.4**). Les tampons utilisés sont décrits dans l'**annexe 5**. Les échantillons fixés sont broyés, puis extraits dans 40 ml de tampon EB1 et incubés 30 min sous agitation dans la glace. Après deux filtrations sur Miracloth (Merck), le filtrat est centrifugé 30 min à 3 500 rpm à 4°C. Les culots sont resuspendus dans 1 ml de tampon EB2 et centrifugés pendant 10 min à 12 000 *g* à 4°C. Dans le cas où les culots obtenus sont trop verts (trop de chlorophylles présentes), ceux-ci sont resuspendus dans 1 ml de tampon EB2bis et centrifugés de nouveau pendant 10 min à 12 000 *g* à 4°C. Les culots sont alors resuspendus dans 300 µl de tampon EB3 et déposés sur un coussin de 300 µl de tampon EB3. Après une dernière

centrifugation de 1 h à 16 000 *g* à 4°C, la chromatine présente dans les culots est finalement resuspendue dans 300 µl de tampon NLB.

1.3 Fragmentation de la chromatine

La chromatine est soniquée grâce à un sonicateur (Bioruptor® Standard, Diagenode) 5 fois pendant 8 min (cycles de 30 sec/30 sec – ON/OFF). L'efficacité de la sonication est évaluée par dépôt sur gel de l'ADN issu de la chromatine avant et après sonication. Après sonication, l'ADN fragmenté doit se présenter sous forme de smear, compris entre 500 et 200 pb. Les débris sont éliminés par centrifugation (16 000g, 5 minutes à 4°C) et 86 µl du surnageant ont été mis de côté pour servir de contrôle sans immunoprécipitation (point "input").

1.4 Immunoprécipitation de la chromatine

Les 200 µl restant sont utilisés pour l'immunoprécipitation.. Une première incubation (pré-clearing) est réalisée sous agitation avec 30 µl de billes couplées à la protéine A (Millipore) et 100 µl de chromatine pendant au moins 1 h à 4°C (pour éliminer les interactions non spécifiques entre la chromatine et les billes). Après élimination des billes et de tous les interactants non-spécifiques par centrifugation (13 000rpm, une minute à 4°C), la deuxième incubation est faite sous agitation à 4°C sur la nuit, en présence de 4 µl d'anticorps dirigés contre la MPT des histones recherchée. Les complexes anticorps-chromatine sont immunoprécipités par incubation avec 40 µl de billes couplées à la protéine A pendant au moins une heure à 4°C. Les complexes immunoprécipités sont collectés par centrifugation à 13 000rpm, une minute à 4°C. Après une série de lavages dans 1mL de tampon Low Salt, High Salt, LiCL et TE, la chromatine est éluée dans 500 µl d'Elution Buffer. 20 µl de NaCl à 5 M sont ajoutés à chaque éluat et ceux-ci sont incubés sur la nuit afin de réverser le pontage. Les éluats sont ensuite traités à la protéinase K (10 µg) pendant 1 h à 45°C. Les acides nucléiques et les inputs sont alors extraits au phénol/chloroforme, suivie d'une précipitation à l'éthanol, et repris dans 50 µl de TE supplémenté en RNAse A à 10 µg/ml. Les tubes sont mis à incuber 30 min à 37°C. Les ADN immunoprécipités sont quantifié par qPCR (**cf. §II.D.3**) à partir de 1 µl d'ADN et 1 µl d'input. Les amorces utilisées sont listées en **annexe 6**. Les ADNs de l'IP avec l'anticorps anti-H3 ont été utilisés pour la normalisation des données.

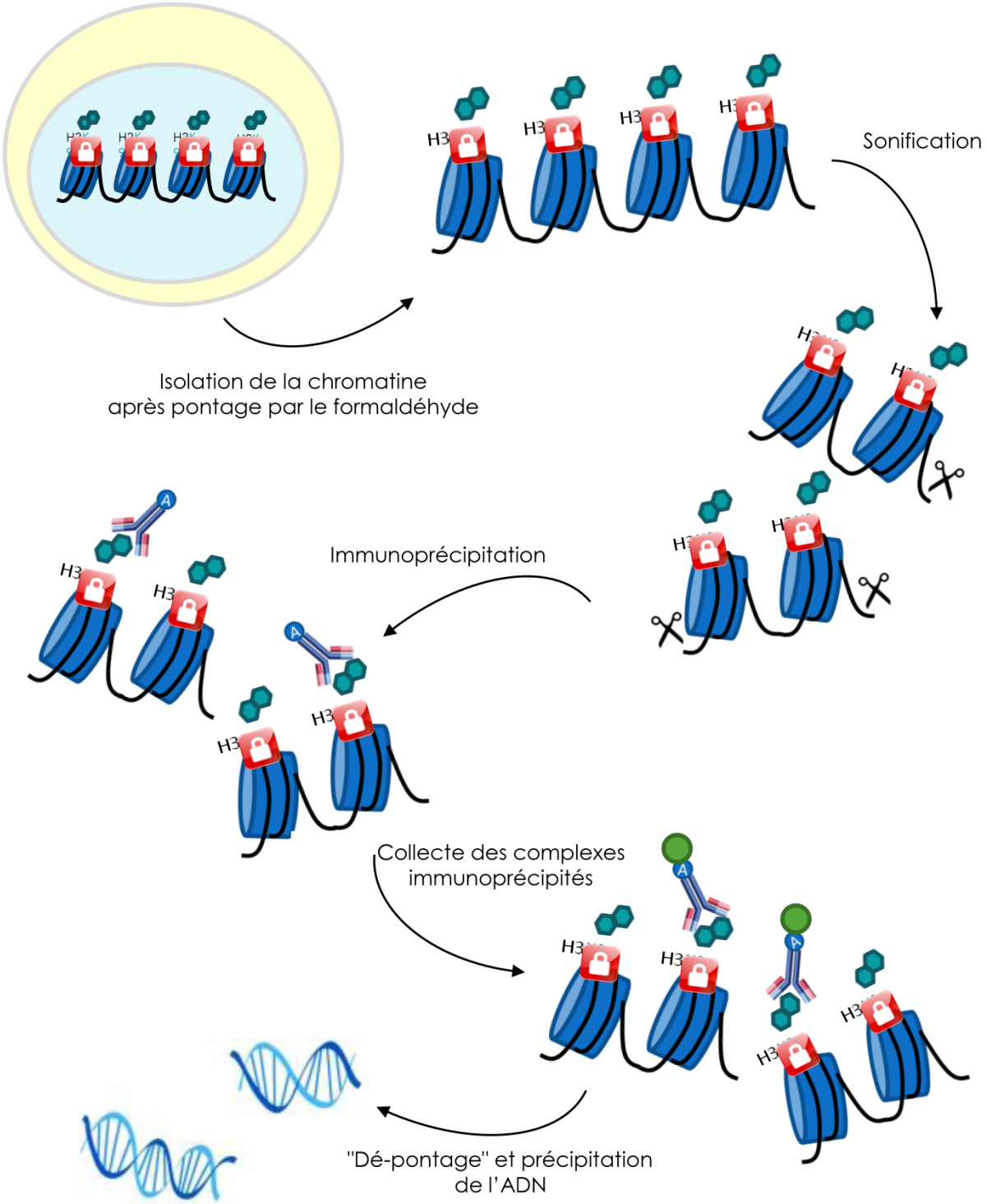


Figure 4.3 : ***Les différentes étapes de l'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)***. Les hexagones verts représentent des MPTs localisées sur les histones, les cadenas symbolisent le pontage ADN-histones, les ronds turquoises représentent les billes d'agarose interagissant avec la protéine A.

III. ANALYSES *IN SILICO*

Les séquences du promoteur (environ 2 kb en amont du site ATG) et du gène *JMJ24* ont été obtenues via le site FlagDB+ (http://urgv.evry.inra.fr/projects/FLAGdb++/HTML/index.shtml).

Les données de séquençages des petits ARNs dans le WT et le mutant *ibm1-4* ont été obtenues sur le site (WT : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSM799868 et *ibm1* : GSM799869) et traitées de manières à associer chaque séquence à un gène par Vincent Thareau. Ne sont conservés que les sRNA possédant 100% d'homologie avec un site unique. Les données de transcriptomique de plantules de 7 jours pour le mutant *dcl3* ont été obtenues sur le site *ftp://urgv.evry.inra.fr/CATdb/data_norm/RS06-06_miRNA_exp73.xls* et les données brutes de transcriptomique de plantules de 14 jours pour le triple mutant *dcl2dcl3dcl4* sur le site (http://cbio.mskcc.org/public/raetschlab/user/zeller/tiling_arrays/small_rna_data/expression_data/annotated_genes/). Ces données sont ensuite croisées entre elles afin d'isoler des gènes dont l'expression ne varie pas dans le simple mutant *dcl3*, ainsi que dans le triple mutant *dcl2dcl3dcl4* par rapport au sauvage, bien qu'une diminution des sRNA les ciblant soit observée.

BIBLIOGRAPHIE

Agger, K., Cloos, P.A.C., Christensen, J., et al. (2007) UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature*, **449**, 731–4.

Ahmad, W., Faiyaz ul Haque, M., Brancolini, V., et al. (1998) Alopecia universalis associated with a mutation in the human hairless gene. *Science*, **279**, 720–4.

Alabadí, D., Oyama, T., Yanovsky, M.J., Harmon, F.G., Más, P. and Kay, S.A. (2001) Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the Arabidopsis circadian clock. *Science*, **293**, 880–3.

Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., et al. (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana. *Science*, **301**, 653–7.

Alvarez-Venegas, R. and Avramova, Z. (2005) Methylation patterns of histone H3 Lys 4, Lys 9 and Lys 27 in transcriptionally active and inactive Arabidopsis genes and in atx1 mutants. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 5199–207.

Alvarez-Venegas, R., Pien, S., Sadder, M., Witmer, X., Grossniklaus, U. and Avramova, Z. (2003) ATX-1, an Arabidopsis homolog of trithorax, activates flower homeotic genes. *Curr. Biol.*, **13**, 627–37.

Arents, G., Burlingame, R.W., Wang, B.C., Love, W.E. and Moudrianakis, E.N. (1991) The nucleosomal core histone octamer at 3.1 A resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **88**, 10148–52.

Ausín, I., Alonso-Blanco, C., Jarillo, J.A., Ruiz-García, L. and Martínez-Zapater, J.M. (2004) Regulation of flowering time by FVE, a retinoblastoma-associated protein. *Nat. Genet.*, **36**, 162–6.

Avramova, Z. (2009) Evolution and pleiotropy of TRITHORAX function in Arabidopsis. *Int. J. Dev. Biol.*, **53**, 371–81.

Baba, A., Ohtake, F., Okuno, Y., et al. (2011) PKA-dependent regulation of the histone lysine demethylase complex PHF2-ARID5B. *Nat. Cell Biol.*, **13**, 668–75.

Banerjee, T. and Chakravarti, D. (2011) A peek into the complex realm of histone phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.*, **31**, 4858–73.

Bannister, A.J. and Kouzarides, T. (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.*, **21**, 381–95.

Bartrina, I., Otto, E., Strnad, M., Werner, T. and Schmülling, T. (2011) Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation, and thus seed yield in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell*, **23**, 69–80.

5. BIBLIOGRAPHIE

Bastow, R., Mylne, J.S., Lister, C., Lippman, Z., Martienssen, R.A. and Dean, C. (2004) Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation. *Nature*, **427**, 164–7.

Bauby, H., Divol, F., Truernit, E., Grandjean, O. and Palauqui, J.-C. (2007) Protophloem differentiation in early Arabidopsis thaliana development. *Plant Cell Physiol.*, **48**, 97–109.

Baulcombe, D. (2004) RNA silencing in plants. *Nature*, **431**, 356–63.

Baumberger, N. and Baulcombe, D.C. (2005) Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 11928–33.

Baumbusch, L.O., Thorstensen, T., Krauss, V., Fischer, A., Naumann, K., Assalkhou, R., Schulz, I., Reuter, G. and Aalen, R.B. (2001) The Arabidopsis thaliana genome contains at least 29 active genes encoding SET domain proteins that can be assigned to four evolutionarily conserved classes. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 4319–33.

Bechtold, N., Ellis, J. and Pelletier, G. In planta Agrobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult Arabidopsis thaliana plants. *Comptes rendus l'Académie des Sci. Série 3, Sci. la vie*, **316**, 1194–1199.

Benhamed, M., Bertrand, C., Servet, C. and Zhou, D.-X. (2006) Arabidopsis GCN5, HD1, and TAF1/HAF2 interact to regulate histone acetylation required for light-responsive gene expression. *Plant Cell*, **18**, 2893–903.

Benková, E. and Hejátko, J. (2009) Hormone interactions at the root apical meristem. *Plant Mol. Biol.*, **69**, 383–96.

Berger, S.L. (2007) The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*, **447**, 407–12.

Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., et al. (2006) A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*, **125**, 315–26.

Berr, A., McCallum, E.J., Ménard, R., Meyer, D., Fuchs, J., Dong, A. and Shen, W.-H. (2010) Arabidopsis SET DOMAIN GROUP2 is required for H3K4 trimethylation and is crucial for both sporophyte and gametophyte development. *Plant Cell*, **22**, 3232–48.

Berr, A., Shafiq, S. and Shen, W.-H. (2011) Histone modifications in transcriptional activation during plant development. *Biochim. Biophys. Acta*, **1809**, 567–76.

Berry, W.L., Shin, S., Lightfoot, S.A. and Janknecht, R. (2012) Oncogenic features of the JMJD2A histone demethylase in breast cancer. *Int. J. Oncol.*, **41**, 1701–6.

Bertone, P., Stolc, V., Royce, T.E., et al. (2004) Global identification of human transcribed sequences with genome tiling arrays. *Science*, **306**, 2242–6.

Bertrand, C., Bergounioux, C., Domenichini, S., Delarue, M. and Zhou, D.-X. (2003) Arabidopsis histone acetyltransferase AtGCN5 regulates the floral meristem activity through the WUSCHEL/AGAMOUS pathway. *J. Biol. Chem.*, **278**, 28246–51.

5. BIBLIOGRAPHIE

Bhattacharyya, N. and Banerjee, D. (1999) Transcriptional regulatory sequences within the first intron of the chicken apolipoproteinAI (apoAI) gene. *Gene*, **234**, 371–80.

Bian, Q. and Belmont, A.S. (2012) Revisiting higher-order and large-scale chromatin organization. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **24**, 359–66.

Blackledge, N.P., Zhou, J.C., Tolstorukov, M.Y., Farcas, A.M., Park, P.J. and Klose, R.J. (2010) CpG islands recruit a histone H3 lysine 36 demethylase. *Mol. Cell*, **38**, 179–90.

Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P.E., Sunkar, R. and Zhu, J.-K. (2005) Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis. *Cell*, **123**, 1279–91.

Bouché, N., Lauressergues, D., Gasciolli, V. and Vaucheret, H. (2006) An antagonistic function for Arabidopsis DCL2 in development and a new function for DCL4 in generating viral siRNAs. *EMBO J.*, **25**, 3347–56.

Bouchez, D., Camilleri, C. and Caboche, M. A binary vector based on Basta resistance for in planta transformation of Arabidopsis thaliana. *Comptes rendus l'Académie des Sci. Série 3, Sci. la vie*, **316**, 1188–1193.

Bouchez, D. and Höfte, H. (1998) Functional genomics in plants. *Plant Physiol.*, **118**, 725–32.

Bowler, C., Benvenuto, G., Laflamme, P., Molino, D., Probst, A. V, Tariq, M. and Paszkowski, J. (2004) Chromatin techniques for plant cells. *Plant J.*, **39**, 776–89.

Boyer, L.A., Plath, K., Zeitlinger, J., et al. (2006) Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature*, **441**, 349–53.

Brauchle, M., Yao, Z., Arora, R., et al. (2013) Protein complex interactor analysis and differential activity of KDM3 subfamily members towards H3K9 methylation. *PLoS One*, **8**, e60549.

Britton, L.-M.P., Gonzales-Cope, M., Zee, B.M. and Garcia, B.A. (2011) Breaking the histone code with quantitative mass spectrometry. *Expert Rev. Proteomics*, **8**, 631–43.

Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y.Y., Sieburth, L. and Voinnet, O. (2008) Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science*, **320**, 1185–90.

Brosnan, C.A. and Voinnet, O. (2011) Cell-to-cell and long-distance siRNA movement in plants: mechanisms and biological implications. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **14**, 580–7.

Brownell, J.E. and Allis, C.D. (1996) Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **6**, 176–84.

Cao, X. and Jacobsen, S.E. (2002a) Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the DRM and CMT3 methyltransferase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99 Suppl 4**, 16491–8.

Cao, X. and Jacobsen, S.E. (2002b) Role of the arabidopsis DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. *Curr. Biol.*, **12**, 1138–44.

5. BIBLIOGRAPHIE

Cao, Y., Dai, Y., Cui, S. and Ma, L. (2008) Histone H2B monoubiquitination in the chromatin of FLOWERING LOCUS C regulates flowering time in Arabidopsis. *Plant Cell*, **20**, 2586–602.

Caro, E., Castellano, M.M. and Gutierrez, C. (2007) A chromatin link that couples cell division to root epidermis patterning in Arabidopsis. *Nature*, **447**, 213–7.

Cartagena, J.A., Matsunaga, S., Seki, M., et al. (2008) The Arabidopsis SDG4 contributes to the regulation of pollen tube growth by methylation of histone H3 lysines 4 and 36 in mature pollen. *Dev. Biol.*, **315**, 355–68.

Chan, S.W.-L., Henderson, I.R. and Jacobsen, S.E. (2005) Gardening the genome: DNA methylation in Arabidopsis thaliana. *Nat. Rev. Genet.*, **6**, 351–60.

Chang, B., Chen, Y., Zhao, Y. and Bruick, R.K. (2007) JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science*, **318**, 444–7.

Charron, J.-B.F., He, H., Elling, A.A. and Deng, X.W. (2009) Dynamic landscapes of four histone modifications during deetiolation in Arabidopsis. *Plant Cell*, **21**, 3732–48.

Chen, Q., Chen, X., Wang, Q., Zhang, F., Lou, Z., Zhang, Q. and Zhou, D.-X. (2013) Structural basis of a histone H3 lysine 4 demethylase required for stem elongation in rice. *PLoS Genet.*, **9**, e1003239.

Chen, X., Hu, Y. and Zhou, D.-X. (2011) Epigenetic gene regulation by plant Jumonji group of histone demethylase. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.*, **1809**, 421–426.

Chen, Z., Zang, J., Whetstine, J., et al. (2006) Structural insights into histone demethylation by JMJD2 family members. *Cell*, **125**, 691–702.

Chevillard-Briet, M., Trouche, D. and Vandel, L. (2002) Control of CBP co-activating activity by arginine methylation. *EMBO J.*, **21**, 5457–66.

Cho, J.-N., Ryu, J.-Y., Jeong, Y.-M., Park, J., Song, J.-J., Amasino, R.M., Noh, B. and Noh, Y.-S. (2012) Control of seed germination by light-induced histone arginine demethylation activity. *Dev. Cell*, **22**, 736–48.

Choi, K., Zhao, X., Kelly, K.A., et al. (2013) Arabidopsis meiotic crossover hot spots overlap with H2A.Z nucleosomes at gene promoters. *Nat. Genet.*, **45**, 1327–36.

Christensen, J., Agger, K., Cloos, P.A.C., et al. (2007) RBP2 belongs to a family of demethylases, specific for tri-and dimethylated lysine 4 on histone 3. *Cell*, **128**, 1063–76.

Clapier, C.R. and Cairns, B.R. (2009) The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu. Rev. Biochem.*, **78**, 273–304.

Cloos, P.A.C., Christensen, J., Agger, K., Maiolica, A., Rappsilber, J., Antal, T., Hansen, K.H. and Helin, K. (2006) The putative oncogene GASC1 demethylates tri- and dimethylated lysine 9 on histone H3. *Nature*, **442**, 307–11.

Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J.*, **16**, 735–43.

5. BIBLIOGRAPHIE

Cokus, S.J., Feng, S., Zhang, X., et al. (2008) Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature*, **452**, 215–9.

Coleman-Derr, D. and Zilberman, D. (2012) Deposition of histone variant H2A.Z within gene bodies regulates responsive genes. *PLoS Genet.*, **8**, e1002988.

Copur, Ö. and Müller, J. (2013) The histone H3-K27 demethylase Utx regulates HOX gene expression in Drosophila in a temporally restricted manner. *Development*, **140**, 3478–85.

Cui, X., Jin, P., Cui, X., et al. (2013) Control of transposon activity by a histone H3K4 demethylase in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **110**, 1953–8.

Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K. and Scheible, W.-R. (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **139**, 5–17.

Czermin, B., Melfi, R., McCabe, D., Seitz, V., Imhof, A. and Pirrotta, V. (2002) Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell*, **111**, 185–96.

Deal, R.B. and Henikoff, S. (2011) The INTACT method for cell type-specific gene expression and chromatin profiling in Arabidopsis thaliana. *Nat. Protoc.*, **6**, 56–68.

Deal, R.B., Topp, C.N., McKinney, E.C. and Meagher, R.B. (2007) Repression of flowering in Arabidopsis requires activation of FLOWERING LOCUS C expression by the histone variant H2A.Z. *Plant Cell*, **19**, 74–83.

Deleris, A., Greenberg, M.V.C., Ausin, I., Law, R.W.Y., Moissiard, G., Schubert, D. and Jacobsen, S.E. (2010) Involvement of a Jumonji-C domain-containing histone demethylase in DRM2-mediated maintenance of DNA methylation. *EMBO Rep.*, **11**, 950–5.

Dillon, S.C., Zhang, X., Trievel, R.C. and Cheng, X. (2005) The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome Biol.*, **6**, 227.

Dong, G., Ma, D.-P. and Li, J. (2008) The histone methyltransferase SDG8 regulates shoot branching in Arabidopsis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **373**, 659–64.

Dou, K., Huang, C.-F., Ma, Z.-Y., et al. (2013) The PRP6-like splicing factor STA1 is involved in RNA-directed DNA methylation by facilitating the production of Pol V-dependent scaffold RNAs. *Nucleic Acids Res.*

Douet, J., Tutois, S. and Tourmente, S. (2009) A Pol V-mediated silencing, independent of RNA-directed DNA methylation, applies to 5S rDNA. *PLoS Genet.*, **5**, e1000690.

Driel, R. van and Fransz, P. (2004) Nuclear architecture and genome functioning in plants and animals: what can we learn from both? *Exp. Cell Res.*, **296**, 86–90.

Du, J., Zhong, X., Bernatavichute, Y. V, et al. (2012) Dual binding of chromomethylase domains to H3K9me2-containing nucleosomes directs DNA methylation in plants. *Cell*, **151**, 167–80.

5. BIBLIOGRAPHIE

Eichten, S.R., Ellis, N.A., Makarevitch, I., et al. (2012) Spreading of heterochromatin is limited to specific families of maize retrotransposons. *PLoS Genet.*, **8**, e1003127.

Fan, D., Dai, Y., Wang, X., Wang, Z., He, H., Yang, H., Cao, Y., Deng, X.W. and Ma, L. (2012) IBM1, a JmjC domain-containing histone demethylase, is involved in the regulation of RNA-directed DNA methylation through the epigenetic control of RDR2 and DCL3 expression in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res.*, **40**, 8905–16.

Feng, W., Yonezawa, M., Ye, J., Jenuwein, T. and Grummt, I. (2010) PHF8 activates transcription of rRNA genes through H3K4me3 binding and H3K9me1/2 demethylation. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 445–50.

Ferrari, K.J., Scelfo, A., Jammula, S., Cuomo, A., Barozzi, I., Stützer, A., Fischle, W., Bonaldi, T. and Pasini, D. (2014) Polycomb-dependent H3K27me1 and H3K27me2 regulate active transcription and enhancer fidelity. *Mol. Cell*, **53**, 49–62.

Finnegan, E.J., Peacock, W.J. and Dennis, E.S. (1996) Reduced DNA methylation in Arabidopsis thaliana results in abnormal plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 8449–54.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. *Nature*, **391**, 806–11.

Flaus, A., Martin, D.M.A., Barton, G.J. and Owen-Hughes, T. (2006) Identification of multiple distinct Snf2 subfamilies with conserved structural motifs. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 2887–905.

Fransz, P. and Jong, H. de (2011) From nucleosome to chromosome: a dynamic organization of genetic information. *Plant J.*, **66**, 4–17.

Fransz, P., Jong, J.H. De, Lysak, M., Castiglione, M.R. and Schubert, I. (2002) Interphase chromosomes in Arabidopsis are organized as well defined chromocenters from which euchromatin loops emanate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 14584–9.

Fritsch, O., Benvenuto, G., Bowler, C., Molinier, J. and Hohn, B. (2004) The INO80 protein controls homologous recombination in Arabidopsis thaliana. *Mol. Cell*, **16**, 479–85.

Gao, Z., Liu, H.-L., Daxinger, L., et al. (2010) An RNA polymerase II- and AGO4-associated protein acts in RNA-directed DNA methylation. *Nature*, **465**, 106–9.

Gasciolli, V., Mallory, A.C., Bartel, D.P. and Vaucheret, H. (2005) Partially redundant functions of Arabidopsis DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-acting siRNAs. *Curr. Biol.*, **15**, 1494–500.

Gaszner, M. and Felsenfeld, G. (2006) Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat. Rev. Genet.*, **7**, 703–13.

Gelvin, S.B. (2000) AGROBACTERIUM AND PLANT GENES INVOLVED IN T-DNA TRANSFER AND INTEGRATION. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **51**, 223–256.

Giraut, L., Falque, M., Drouaud, J., Pereira, L., Martin, O.C. and Mézard, C. (2011) Genome-wide crossover distribution in Arabidopsis thaliana meiosis reveals sex-specific patterns along chromosomes. M. Lichten, ed. *PLoS Genet.*, **7**, e1002354.

5. BIBLIOGRAPHIE

Goll, M.G. and Bestor, T.H. (2005) Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.*, **74**, 481–514.

Grafi, G., Zemach, A. and Pitto, L. (2007) Methyl-CpG-binding domain (MBD) proteins in plants. *Biochim. Biophys. Acta*, **1769**, 287–94.

Grewal, S.I.S. and Elgin, S.C.R. (2007) Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature*, **447**, 399–406.

Grewal, S.I.S. and Jia, S. (2007) Heterochromatin revisited. *Nat. Rev. Genet.*, **8**, 35–46.

Grunstein, M. (1998) Yeast heterochromatin: regulation of its assembly and inheritance by histones. *Cell*, **93**, 325–8.

Guenatri, M., Bailly, D., Maison, C. and Almouzni, G. (2004) Mouse centric and pericentric satellite repeats form distinct functional heterochromatin. *J. Cell Biol.*, **166**, 493–505.

Guo, L., Yin, B., Zhou, J., Li, X. and Deng, X.W. (2006) Development of rabbit monoclonal and polyclonal antibodies for detection of site-specific histone modifications and their application in analyzing overall modification levels. *Cell Res.*, **16**, 519–27.

Guo, L., Yu, Y., Law, J.A. and Zhang, X. (2010) SET DOMAIN GROUP2 is the major histone H3 lysine [corrected] 4 trimethyltransferase in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **107**, 18557–62.

Haag, J.R. and Pikaard, C.S. (2011) Multisubunit RNA polymerases IV and V: purveyors of non-coding RNA for plant gene silencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **12**, 483–92.

Haag, J.R., Ream, T.S., Marasco, M., Nicora, C.D., Norbeck, A.D., Pasa-Tolic, L. and Pikaard, C.S. (2012) In vitro transcription activities of Pol IV, Pol V, and RDR2 reveal coupling of Pol IV and RDR2 for dsRNA synthesis in plant RNA silencing. *Mol. Cell*, **48**, 811–8.

Hajdukiewicz, P., Svab, Z. and Maliga, P. (1994) The small, versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation. *Plant Mol. Biol.*, **25**, 989–94.

Harmer, S.L. (2009) The circadian system in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **60**, 357–77.

Havecker, E.R., Wallbridge, L.M., Hardcastle, T.J., Bush, M.S., Kelly, K.A., Dunn, R.M., Schwach, F., Doonan, J.H. and Baulcombe, D.C. (2010) The Arabidopsis RNA-directed DNA methylation argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci. *Plant Cell*, **22**, 321–34.

He, Y., Michaels, S.D. and Amasino, R.M. (2003) Regulation of flowering time by histone acetylation in Arabidopsis. *Science*, **302**, 1751–4.

Hetzl, J., Foerster, A.M., Raidl, G. and Mittelsten Scheid, O. (2007) CyMATE: a new tool for methylation analysis of plant genomic DNA after bisulphite sequencing. *Plant J.*, **51**, 526–36.

Hillringhaus, L., Yue, W.W., Rose, N.R., et al. (2011) Structural and evolutionary basis for the dual substrate selectivity of human KDM4 histone demethylase family. *J. Biol. Chem.*, **286**, 41616–25.

Himber, C., Dunoyer, P., Moissiard, G., Ritzenthaler, C. and Voinnet, O. (2003) Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J.*, **22**, 4523–33.

Ho, K.K., Zhang, H., Golden, B.L. and Ogas, J. (2013) PICKLE is a CHD subfamily II ATP-dependent chromatin remodeling factor. *Biochim. Biophys. Acta*, **1829**, 199–210.

Hong, S., Cho, Y.-W., Yu, L.-R., Yu, H., Veenstra, T.D. and Ge, K. (2007) Identification of JmjC domain-containing UTX and JMJD3 as histone H3 lysine 27 demethylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**, 18439–44.

Hou, H. and Yu, H. (2010) Structural insights into histone lysine demethylation. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **20**, 739–48.

Hu, Y., Liu, D., Zhong, X., Zhang, C., Zhang, Q. and Zhou, D.-X. (2012) CHD3 protein recognizes and regulates methylated histone H3 lysines 4 and 27 over a subset of targets in the rice genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **109**, 5773–8.

Hu, Y., Shen, Y., Conde E Silva, N. and Zhou, D.-X. (2011) The role of histone methylation and H2A.Z occupancy during rapid activation of ethylene responsive genes. *PLoS One*, **6**, e28224.

Hu, Y., Zhu, N., Wang, X., Yi, Q., Zhu, D., Lai, Y. and Zhao, Y. (2013) Analysis of rice Snf2 family proteins and their potential roles in epigenetic regulation. *Plant Physiol. Biochem.*, **70**, 33–42.

Huang, Y., Fang, J., Bedford, M.T., Zhang, Y. and Xu, R.-M. (2006) Recognition of histone H3 lysine-4 methylation by the double tudor domain of JMJD2A. *Science*, **312**, 748–51.

Huisinga, K.L., Brower-Toland, B. and Elgin, S.C.R. (2006) The contradictory definitions of heterochromatin: transcription and silencing. *Chromosoma*, **115**, 110–22.

Inagaki, S., Miura-Kamio, A., Nakamura, Y., Lu, F., Cui, X., Cao, X., Kimura, H., Saze, H. and Kakutani, T. (2010) Autocatalytic differentiation of epigenetic modifications within the Arabidopsis genome. *EMBO J.*, **29**, 3496–506.

Jackson, J.P., Johnson, L., Jasencakova, Z., et al. (2004) Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in Arabidopsis thaliana. *Chromosoma*, **112**, 308–15.

Jackson, J.P., Lindroth, A.M., Cao, X. and Jacobsen, S.E. (2002) Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature*, **416**, 556–60.

Jacob, Y., Feng, S., LeBlanc, C.A., et al. (2009) ATXR5 and ATXR6 are H3K27 monomethyltransferases required for chromatin structure and gene silencing. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16**, 763–8.

Jeong, J.-H., Song, H.-R., Ko, J.-H., Jeong, Y.-M., Kwon, Y.E., Seol, J.H., Amasino, R.M., Noh, B. and Noh, Y.-S. (2009) Repression of FLOWERING LOCUS T chromatin by functionally redundant histone H3 lysine 4 demethylases in Arabidopsis. *PLoS One*, **4**, e8033.

Johnson, L.M., Bostick, M., Zhang, X., Kraft, E., Henderson, I., Callis, J. and Jacobsen, S.E. (2007) The SRA methyl-cytosine-binding domain links DNA and histone methylation. *Curr. Biol.*, **17**, 379–84.

Jones, M. a, Covington, M.F., DiTacchio, L., Vollmers, C., Panda, S. and Harmer, S.L. (2010) Jumonji domain protein JMJD5 functions in both the plant and human circadian systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **107**, 21623–8.

Jones, M.A. and Harmer, S. (2011) JMJD5 Functions in concert with TOC1 in the arabidopsis circadian system. *Plant Signal. Behav.*, **6**, 445–8.

Kahn, T.G., Schwartz, Y.B., Dellino, G.I. and Pirrotta, V. (2006) Polycomb complexes and the propagation of the methylation mark at the Drosophila ubx gene. *J. Biol. Chem.*, **281**, 29064–75.

Kapranov, P., Cawley, S.E., Drenkow, J., Bekiranov, S., Strausberg, R.L., Fodor, S.P.A. and Gingeras, T.R. (2002) Large-scale transcriptional activity in chromosomes 21 and 22. *Science*, **296**, 916–9.

Karpen, G.H. and Allshire, R.C. (1997) The case for epigenetic effects on centromere identity and function. *Trends Genet.*, **13**, 489–96.

Kato, M., Miura, A., Bender, J., Jacobsen, S.E. and Kakutani, T. (2003) Role of CG and non-CG methylation in immobilization of transposons in Arabidopsis. *Curr. Biol.*, **13**, 421–6.

Katoh, M. and Katoh, M. (2004) Identification and characterization of JMJD2 family genes in silico. *Int. J. Oncol.*, **24**, 1623–8.

Khan, A.R., Enjalbert, J., Marsollier, A.-C., Rousselet, A., Goldringer, I. and Vitte, C. (2013) Vernalization treatment induces site-specific DNA hypermethylation at the VERNALIZATION-A1 (VRN-A1) locus in hexaploid winter wheat. *BMC Plant Biol.*, **13**, 209.

Kim, J.-Y., Kim, K.-B., Eom, G.H., et al. (2012) KDM3B is the H3K9 demethylase involved in transcriptional activation of lmo2 in leukemia. *Mol. Cell. Biol.*, **32**, 2917–33.

Kim, W., Benhamed, M., Servet, C., Latrasse, D., Zhang, W., Delarue, M. and Zhou, D.-X. (2009) Histone acetyltransferase GCN5 interferes with the miRNA pathway in Arabidopsis. *Cell Res.*, **19**, 899–909.

Kimura, H., Hayashi-Takanaka, Y., Goto, Y., Takizawa, N. and Nozaki, N. (2008) The organization of histone H3 modifications as revealed by a panel of specific monoclonal antibodies. *Cell Struct. Funct.*, **33**, 61–73.

Klose, R.J., Kallin, E.M. and Zhang, Y. (2006) JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat. Rev. Genet.*, **7**, 715–27.

Klose, R.J., Yamane, K., Bae, Y., Zhang, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wong, J. and Zhang, Y. (2006) The transcriptional repressor JHDM3A demethylates trimethyl histone H3 lysine 9 and lysine 36. *Nature*, **442**, 312–6.

Kooistra, S.M. and Helin, K. (2012) Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 297–311.

Kouzarides, T. (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell*, **128**, 693–705.

Kumar, S.V. and Wigge, P.A. (2010) H2A.Z-Containing Nucleosomes Mediate the Thermosensory Response in Arabidopsis. *Cell*, **140**, 136–147.

Latrasse, D., Benhamed, M., Henry, Y., Domenichini, S., Kim, W., Zhou, D.-X. and Delarue, M. (2008) The MYST histone acetyltransferases are essential for gametophyte development in Arabidopsis. *BMC Plant Biol.*, **8**, 121.

Laubinger, S., Zeller, G., Henz, S.R., Buechel, S., Sachsenberg, T., Wang, J.-W., Rätsch, G. and Weigel, D. (2010) Global effects of the small RNA biogenesis machinery on the Arabidopsis thaliana transcriptome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **107**, 17466–73.

Law, J.A., Ausin, I., Johnson, L.M., Vashisht, A.A., Zhu, J.-K., Wohlschlegel, J.A. and Jacobsen, S.E. (2010) A protein complex required for polymerase V transcripts and RNA- directed DNA methylation in Arabidopsis. *Curr. Biol.*, **20**, 951–6.

Law, J.A., Du, J., Hale, C.J., Feng, S., Krajewski, K., Palanca, A.M.S., Strahl, B.D., Patel, D.J. and Jacobsen, S.E. (2013) Polymerase IV occupancy at RNA-directed DNA methylation sites requires SHH1. *Nature*, **498**, 385–9.

Law, J.A. and Jacobsen, S.E. (2011) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. , **11**, 204–220.

Law, J.A., Vashisht, A.A., Wohlschlegel, J.A. and Jacobsen, S.E. (2011) SHH1, a homeodomain protein required for DNA methylation, as well as RDR2, RDM4, and chromatin remodeling factors, associate with RNA polymerase IV. *PLoS Genet.*, **7**, e1002195.

Lee, J., Thompson, J.R., Botuyan, M.V. and Mer, G. (2008) Distinct binding modes specify the recognition of methylated histones H3K4 and H4K20 by JMJD2A-tudor. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 109–11.

Lee, K.K. and Workman, J.L. (2007) Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 284–95.

Lee, M.G., Norman, J., Shilatifard, A. and Shiekhattar, R. (2007) Physical and functional association of a trimethyl H3K4 demethylase and Ring6a/MBLR, a polycomb-like protein. *Cell*, **128**, 877–87.

Lee, M.G., Wynder, C., Cooch, N. and Shiekhattar, R. (2005) An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation. *Nature*, **437**, 432–5.

Lee, T.I., Jenner, R.G., Boyer, L.A., et al. (2006) Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell*, **125**, 301–13.

Li, B., Carey, M. and Workman, J.L. (2007) The role of chromatin during transcription. *Cell*, **128**, 707–19.

Li, J., Yang, Z., Yu, B., Liu, J. and Chen, X. (2005) Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis. *Curr. Biol.*, **15**, 1501–7.

5. BIBLIOGRAPHIE

Li, T., Chen, X., Zhong, X., Zhao, Y., Liu, X., Zhou, S., Cheng, S. and Zhou, D.-X. (2013) Jumonji C Protein JMJ705-Mediated Removal of Histone H3 Lysine 27 Trimethylation Is Involved in Defense-Related Gene Activation in Rice. *Plant Cell*.

Li, W., Zhao, L., Zang, W., Liu, Z., Chen, L., Liu, T., Xu, D. and Jia, J. (2011) *Histone demethylase JMJD2B is required for tumor cell proliferation and survival and is overexpressed in gastric cancer*,.

Lindroth, A.M., Shultis, D., Jasencakova, Z., et al. (2004) Dual histone H3 methylation marks at lysines 9 and 27 required for interaction with CHROMOMETHYLASE3. *EMBO J.*, **23**, 4286–96.

Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R.H., et al. (2009) Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, **462**, 315–22.

Liu, C., Lu, F., Cui, X. and Cao, X. (2010) Histone methylation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **61**, 395–420.

Liu, L., Kim, H., Casta, A., Kobayashi, Y., Shapiro, L.S. and Christiano, A.M. (2013) Hairless is a histone H3K9 demethylase. *FASEB J.*

Liu, W., Tanasa, B., Tyurina, O. V, et al. (2010) PHF8 mediates histone H4 lysine 20 demethylation events involved in cell cycle progression. *Nature*, **466**, 508–12.

Lorenzo, A. Di and Bedford, M.T. (2011) Histone arginine methylation. *FEBS Lett.*, **585**, 2024–31.

Lu, F., Cui, X., Zhang, S., Jenuwein, T. and Cao, X. (2011) Arabidopsis REF6 is a histone H3 lysine 27 demethylase. *Nat. Genet.*, **43**, 715–9.

Lu, F., Cui, X., Zhang, S., Liu, C. and Cao, X. (2010) JMJ14 is an H3K4 demethylase regulating flowering time in Arabidopsis. *Cell Res.*, **20**, 387–90.

Lu, F., Li, G., Cui, X., Liu, C., Wang, X.-J. and Cao, X. (2008) Comparative analysis of JmjC domain-containing proteins reveals the potential histone demethylases in Arabidopsis and rice. *J. Integr. Plant Biol.*, **50**, 886–96.

Lu, S.X., Knowles, S.M., Webb, C.J., Celaya, R.B., Cha, C., Siu, J.P. and Tobin, E.M. (2011) The Jumonji C domain-containing protein JMJ30 regulates period length in the Arabidopsis circadian clock. *Plant Physiol.*, **155**, 906–15.

Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. and Richmond, T.J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. *Nature*, **389**, 251–60.

Lusser, A., Kölle, D. and Loidl, P. (2001) Histone acetylation: lessons from the plant kingdom. *Trends Plant Sci.*, **6**, 59–65.

Malik, H.S. and Henikoff, S. (2003) Phylogenomics of the nucleosome. *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 882–91.

Martin, C. and Zhang, Y. (2005) The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 838–49.

Masson, I. Le, Jauvion, V., Bouteiller, N., Rivard, M., Elmayan, T. and Vaucheret, H. (2012) Mutations in the Arabidopsis H3K4me2/3 demethylase JMJ14 suppress posttranscriptional gene silencing by decreasing transgene transcription. *Plant Cell*, **24**, 3603–12.

Mathieu, O., Jasencakova, Z., Vaillant, I., Gendrel, A.-V., Colot, V., Schubert, I. and Tourmente, S. (2003) Changes in 5S rDNA chromatin organization and transcription during heterochromatin establishment in Arabidopsis. *Plant Cell*, **15**, 2929–39.

Mathieu, O., Probst, A. V and Paszkowski, J. (2005) Distinct regulation of histone H3 methylation at lysines 27 and 9 by CpG methylation in Arabidopsis. *EMBO J.*, **24**, 2783–91.

Melnyk, C.W., Molnar, A. and Baulcombe, D.C. (2011) Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. *EMBO J.*, **30**, 3553–3563.

Meneghini, M.D., Wu, M. and Madhani, H.D. (2003) Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell*, **112**, 725–36.

Michaels, S.D. and Amasino, R.M. (1999) FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell*, **11**, 949–56.

Mikkelsen, T.S., Ku, M., Jaffe, D.B., et al. (2007) Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*, **448**, 553–60.

Miura, A., Nakamura, M., Inagaki, S., Kobayashi, A., Saze, H. and Kakutani, T. (2009) An Arabidopsis jmjC domain protein protects transcribed genes from DNA methylation at CHG sites. *EMBO J.*, **28**, 1078–86.

Miura, A., Yonebayashi, S., Watanabe, K., Toyama, T., Shimada, H. and Kakutani, T. (2001) Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in Arabidopsis. *Nature*, **411**, 212–4.

Mizzen, C.A. and Allis, C.D. (1998) Linking histone acetylation to transcriptional regulation. *Cell. Mol. Life Sci.*, **54**, 6–20.

Molina-Serrano, D., Schiza, V. and Kirmizis, A. (2013) Cross-talk among epigenetic modifications: lessons from histone arginine methylation. *Biochem. Soc. Trans.*, **41**, 751–9.

Molnar, A., Melnyk, C.W., Bassett, A., Hardcastle, T.J., Dunn, R. and Baulcombe, D.C. (2010) Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science*, **328**, 872–5.

Morales Torres, C., Laugesen, A. and Helin, K. (2013) Utx is required for proper induction of ectoderm and mesoderm during differentiation of embryonic stem cells. *PLoS One*, **8**, e60020.

Mosammaparast, N. and Shi, Y. (2010) Reversal of histone methylation: biochemical and molecular mechanisms of histone demethylases. *Annu. Rev. Biochem.*, **79**, 155–79.

Müller, J. and Kassis, J.A. (2006) Polycomb response elements and targeting of Polycomb group proteins in Drosophila. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **16**, 476–84.

Mylne, J.S., Barrett, L., Tessadori, F., Mesnage, S., Johnson, L., Bernatavichute, Y. V, Jacobsen, S.E., Fransz, P. and Dean, C. (2006) LHP1, the Arabidopsis homologue of

HETEROCHROMATIN PROTEIN1, is required for epigenetic silencing of FLC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 5012–7.

Ng, S.S., Kavanagh, K.L., McDonough, M.A., et al. (2007) Crystal structures of histone demethylase JMJD2A reveal basis for substrate specificity. *Nature*, **448**, 87–91.

Nishioka, K., Chuikov, S., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Allis, C.D., Tempst, P. and Reinberg, D. (2002) Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes Dev.*, **16**, 479–89.

Niu, L., Lu, F., Pei, Y., Liu, C. and Cao, X. (2007) Regulation of flowering time by the protein arginine methyltransferase AtPRMT10. *EMBO Rep.*, **8**, 1190–5.

Niu, L., Zhang, Y., Pei, Y., Liu, C. and Cao, X. (2008) Redundant requirement for a pair of PROTEIN ARGININE METHYLTRANSFERASE4 homologs for the proper regulation of Arabidopsis flowering time. *Plant Physiol.*, **148**, 490–503.

Noh, B., Lee, S.-H., Kim, H.-J., et al. (2004) Divergent roles of a pair of homologous jumonji/zinc-finger-class transcription factor proteins in the regulation of Arabidopsis flowering time. *Plant Cell*, **16**, 2601–13.

Nuthikattu, S., McCue, A.D., Panda, K., Fultz, D., DeFraia, C., Thomas, E.N. and Slotkin, R.K. (2013) The initiation of epigenetic silencing of active transposable elements is triggered by RDR6 and 21-22 nucleotide small interfering RNAs. *Plant Physiol.*, **162**, 116–31.

Oki, M., Aihara, H. and Ito, T. (2007) Role of histone phosphorylation in chromatin dynamics and its implications in diseases. *Subcell. Biochem.*, **41**, 319–36.

Olins, D.E. and Olins, A.L. (2003) Chromatin history: our view from the bridge. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 809–14.

Pagnussat, G.C., Yu, H.-J., Ngo, Q.A., et al. (2005) Genetic and molecular identification of genes required for female gametophyte development and function in Arabidopsis. *Development*, **132**, 603–14.

Palauqui, J.C., Elmayan, T., Pollien, J.M. and Vaucheret, H. (1997) Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J.*, **16**, 4738–45.

Palmer, D.K., O'Day, K., Wener, M.H., Andrews, B.S. and Margolis, R.L. (1987) A 17-kD centromere protein (CENP-A) copurifies with nucleosome core particles and with histones. *J. Cell Biol.*, **104**, 805–15.

Papp, B. and Müller, J. (2006) Histone trimethylation and the maintenance of transcriptional ON and OFF states by trxG and PcG proteins. *Genes Dev.*, **20**, 2041–54.

Parent, J.-S., Martínez de Alba, A.E. and Vaucheret, H. (2012) The origin and effect of small RNA signaling in plants. *Front. Plant Sci.*, **3**, 179.

Park, S., Oh, S. and Nocker, S. van (2012) Genomic and gene-level distribution of histone H3 dimethyl lysine-27 (H3K27me2) in Arabidopsis. *PLoS One*, **7**, e52855.

Parthun, M.R. (2007) Hat1: the emerging cellular roles of a type B histone acetyltransferase. *Oncogene*, **26**, 5319–28.

Pasini, D., Hansen, K.H., Christensen, J., Agger, K., Cloos, P.A.C. and Helin, K. (2008) Coordinated regulation of transcriptional repression by the RBP2 H3K4 demethylase and Polycomb-Repressive Complex 2. *Genes Dev.*, **22**, 1345–55.

Pavet, V., Quintero, C., Cecchini, N.M., Rosa, A.L. and Alvarez, M.E. (2006) Arabidopsis displays centromeric DNA hypomethylation and cytological alterations of heterochromatin upon attack by pseudomonas syringae. *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, **19**, 577–87.

Pawlowski, W.P. (2010) Chromosome organization and dynamics in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **13**, 640–645.

Pedersen, M.T. and Helin, K. (2010) Histone demethylases in development and disease. *Trends Cell Biol.*, **20**, 662–71.

Pei, Y., Niu, L., Lu, F., Liu, C., Zhai, J., Kong, X. and Cao, X. (2007) Mutations in the Type II protein arginine methyltransferase AtPRMT5 result in pleiotropic developmental defects in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **144**, 1913–23.

Peng, J.C., Valouev, A., Swigut, T., Zhang, J., Zhao, Y., Sidow, A. and Wysocka, J. (2009) Jarid2/Jumonji coordinates control of PRC2 enzymatic activity and target gene occupancy in pluripotent cells. *Cell*, **139**, 1290–302.

Pien, S. and Grossniklaus, U. (2007) Polycomb group and trithorax group proteins in Arabidopsis. *Biochim. Biophys. Acta*, **1769**, 375–82.

Pontes, O., Costa-Nunes, P., Vithayathil, P. and Pikaard, C.S. (2009) RNA polymerase V functions in Arabidopsis interphase heterochromatin organization independently of the 24-nt siRNA-directed DNA methylation pathway. *Mol. Plant*, **2**, 700–10.

Pontier, D., Picart, C., Roudier, F., et al. (2012) NERD, a plant-specific GW protein, defines an additional RNAi-dependent chromatin-based pathway in Arabidopsis. *Mol. Cell*, **48**, 121–32.

Probst, A. V, Fransz, P.F., Paszkowski, J. and Mittelsten Scheid, O. (2003) Two means of transcriptional reactivation within heterochromatin. *Plant J.*, **33**, 743–9.

Raab, J.R., Chiu, J., Zhu, J., Katzman, S., Kurukuti, S., Wade, P.A., Haussler, D. and Kamakaka, R.T. (2012) Human tRNA genes function as chromatin insulators. *EMBO J.*, **31**, 330–50.

Rajagopalan, R., Vaucheret, H., Trejo, J. and Bartel, D.P. (2006) A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in Arabidopsis thaliana. *Genes Dev.*, **20**, 3407–25.

Redman, J.C., Haas, B.J., Tanimoto, G. and Town, C.D. (2004) Development and evaluation of an Arabidopsis whole genome Affymetrix probe array. *Plant J.*, **38**, 545–61.

Rigal, M., Kevei, Z., Pélissier, T. and Mathieu, O. (2012) DNA methylation in an intron of the IBM1 histone demethylase gene stabilizes chromatin modification patterns. *EMBO J.*, **31**, 2981–93.

Rizzo, P.A. Del, Krishnan, S. and Trievel, R.C. (2012) Crystal structure and functional analysis of JMJD5 indicate an alternate specificity and function. *Mol. Cell. Biol.*, **32**, 4044–52.

Rosso, M.G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K. and Weisshaar, B. (2003) An Arabidopsis thaliana T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol. Biol.*, **53**, 247–59.

Roth, S.Y., Denu, J.M. and Allis, C.D. (2001) Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.*, **70**, 81–120.

Ruiz-Ferrer, V. and Voinnet, O. (2009) Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **60**, 485–510.

Rupp, H.M., Frank, M., Werner, T., Strnad, M. and Schmülling, T. (1999) Increased steady state mRNA levels of the STM and KNAT1 homeobox genes in cytokinin overproducing Arabidopsis thaliana indicate a role for cytokinins in the shoot apical meristem. *Plant J.*, **18**, 557–63.

Saleh, A., Al-Abdallat, A., Ndamukong, I., Alvarez-Venegas, R. and Avramova, Z. (2007) The Arabidopsis homologs of trithorax (ATX1) and enhancer of zeste (CLF) establish "bivalent chromatin marks" at the silent AGAMOUS locus. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 6290–6.

Saleh, A., Alvarez-Venegas, R., Yilmaz, M., et al. (2008) The highly similar Arabidopsis homologs of trithorax ATX1 and ATX2 encode proteins with divergent biochemical functions. *Plant Cell*, **20**, 568–79.

Sánchez, C., Sánchez, I., Demmers, J.A.A., Rodriguez, P., Strouboulis, J. and Vidal, M. (2007) Proteomics analysis of Ring1B/Rnf2 interactors identifies a novel complex with the Fbxl10/Jhdm1B histone demethylase and the Bcl6 interacting corepressor. *Mol. Cell. Proteomics*, **6**, 820–34.

Saze, H. and Kakutani, T. (2007) Heritable epigenetic mutation of a transposon-flanked Arabidopsis gene due to lack of the chromatin-remodeling factor DDM1. *EMBO J.*, **26**, 3641–52.

Saze, H., Shiraishi, A., Miura, A. and Kakutani, T. (2008) Control of genic DNA methylation by a jmjC domain-containing protein in Arabidopsis thaliana. *Science*, **319**, 462–5.

Scarpella, E. and Helariutta, Y. (2010) Vascular pattern formation in plants. *Curr. Top. Dev. Biol.*, **91**, 221–65.

Schauer, S.E., Schlüter, P.M., Baskar, R., Gheyselinck, J., Bolaños, A., Curtis, M.D. and Grossniklaus, U. (2009) Intronic regulatory elements determine the divergent expression patterns of AGAMOUS-LIKE6 subfamily members in Arabidopsis. *Plant J.*, **59**, 987–1000.

Schmitz, R.J., Tamada, Y., Doyle, M.R., Zhang, X. and Amasino, R.M. (2009) Histone H2B deubiquitination is required for transcriptional activation of FLOWERING LOCUS C and for proper control of flowering in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **149**, 1196–204.

Schwartz, Y.B., Kahn, T.G., Nix, D.A., Li, X.-Y., Bourgon, R., Biggin, M. and Pirrotta, V. (2006) Genome-wide analysis of Polycomb targets in Drosophila melanogaster. *Nat. Genet.*, **38**, 700–5.

Scibetta, A.G., Santangelo, S., Coleman, J., Hall, D., Chaplin, T., Copier, J., Catchpole, S., Burchell, J. and Taylor-Papadimitriou, J. (2007) Functional analysis of the transcription repressor PLU-1/JARID1B. *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 7220–35.

Searle, I.R., Pontes, O., Melnyk, C.W., Smith, L.M. and Baulcombe, D.C. (2010) JMJ14, a JmjC domain protein, is required for RNA silencing and cell-to-cell movement of an RNA silencing signal in Arabidopsis. *Genes Dev.*, **24**, 986–91.

Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A. and Shi, Y. (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*, **119**, 941–53.

Shpargel, K.B., Sengoku, T., Yokoyama, S. and Magnuson, T. (2012) UTX and UTY demonstrate histone demethylase-independent function in mouse embryonic development. *PLoS Genet.*, **8**, e1002964.

Shu, H., Wildhaber, T., Siretskiy, A., Gruissem, W. and Hennig, L. (2012) Distinct modes of DNA accessibility in plant chromatin. *Nat. Commun.*, **3**, 1281.

Silverman, T.A., Noguchi, M. and Safer, B. (1992) Role of sequences within the first intron in the regulation of expression of eukaryotic initiation factor 2 alpha. *J. Biol. Chem.*, **267**, 9738–42.

Singer, T., Fan, Y., Chang, H.-S., Zhu, T., Hazen, S.P. and Briggs, S.P. (2006) A high-resolution map of Arabidopsis recombinant inbred lines by whole-genome exon array hybridization. *PLoS Genet.*, **2**, e144.

Slotkin, R.K., Vaughn, M., Borges, F., Tanurdzić, M., Becker, J.D., Feijó, J. a and Martienssen, R. a (2009) Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen. *Cell*, **136**, 461–72.

Smith, C.D., Shu, S., Mungall, C.J. and Karpen, G.H. (2007) The Release 5.1 annotation of Drosophila melanogaster heterochromatin. *Science*, **316**, 1586–91.

Smith, L.M., Pontes, O., Searle, I., Yelina, N., Yousafzai, F.K., Herr, A.J., Pikaard, C.S. and Baulcombe, D.C. (2007) An SNF2 protein associated with nuclear RNA silencing and the spread of a silencing signal between cells in Arabidopsis. *Plant Cell*, **19**, 1507–21.

Smyth, D.R., Bowman, J.L. and Meyerowitz, E.M. (1990) Early flower development in Arabidopsis. *Plant Cell*, **2**, 755–67.

Soppe, W.J.J., Jasencakova, Z., Houben, A., Kakutani, T., Meister, A., Huang, M.S., Jacobsen, S.E., Schubert, I. and Fransz, P.F. (2002) DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in Arabidopsis. *EMBO J.*, **21**, 6549–6559.

Steward, M.M., Lee, J.-S., O'Donovan, A., Wyatt, M., Bernstein, B.E. and Shilatifard, A. (2006) Molecular regulation of H3K4 trimethylation by ASH2L, a shared subunit of MLL complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **13**, 852–4.

Stockinger, E.J., Mao, Y., Regier, M.K., Triezenberg, S.J. and Thomashow, M.F. (2001) Transcriptional adaptor and histone acetyltransferase proteins in Arabidopsis and their interactions with CBF1, a transcriptional activator involved in cold-regulated gene expression. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 1524–33.

Strahl, B.D. and Allis, C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**, 41–5.

Stroud, H., Do, T., Du, J., Zhong, X., Feng, S., Johnson, L., Patel, D.J. and Jacobsen, S.E. (2014) Non-CG methylation patterns shape the epigenetic landscape in Arabidopsis. *Nat. Struct. Mol. Biol.*

Sun, Q. and Zhou, D.-X. (2008) Rice jmjC domain-containing gene JMJ706 encodes H3K9 demethylase required for floral organ development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **105**, 13679–84.

Sung, S., He, Y., Eshoo, T.W., Tamada, Y., Johnson, L., Nakahigashi, K., Goto, K., Jacobsen, S.E. and Amasino, R.M. (2006) Epigenetic maintenance of the vernalized state in Arabidopsis thaliana requires LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1. *Nat. Genet.*, **38**, 706–10.

Takeuchi, T., Yamazaki, Y., Katoh-Fukui, Y., Tsuchiya, R., Kondo, S., Motoyama, J. and Higashinakagawa, T. (1995) Gene trap capture of a novel mouse gene, jumonji, required for neural tube formation. *Genes Dev.*, **9**, 1211–22.

Tamada, Y., Yun, J.-Y., Woo, S.C. and Amasino, R.M. (2009) ARABIDOPSIS TRITHORAX-RELATED7 is required for methylation of lysine 4 of histone H3 and for transcriptional activation of FLOWERING LOCUS C. *Plant Cell*, **21**, 3257–69.

Tessadori, F., Chupeau, M.-C., Chupeau, Y., Knip, M., Germann, S., Driel, R. van, Fransz, P. and Gaudin, V. (2007) Large-scale dissociation and sequential reassembly of pericentric heterochromatin in dedifferentiated Arabidopsis cells. *J. Cell Sci.*, **120**, 1200–8.

Tessadori, F., Schulkes, R.K., Driel, R. van and Fransz, P. (2007) Light-regulated large-scale reorganization of chromatin during the floral transition in Arabidopsis. *Plant J.*, **50**, 848–57.

Tessadori, F., Zanten, M. van, Pavlova, P., et al. (2009) Phytochrome B and histone deacetylase 6 control light-induced chromatin compaction in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet.*, **5**, e1000638.

Timmermans, M.C.P., Breuninger, H. and Lenhard, M. (2010) Control of Tissue and Organ Growth in Plants. In *Current Topics in Developmental Biology*. pp. 185–220.

Todeschini, A.-L., Teysset, L., Delmarre, V. and Ronsseray, S. (2010) The epigenetic trans-silencing effect in Drosophila involves maternally-transmitted small RNAs whose production depends on the piRNA pathway and HP1. *PLoS One*, **5**, e11032.

Traas, J., Hülskamp, M., Gendreau, E. and Höfte, H. (1998) Endoreduplication and development: rule without dividing? *Curr. Opin. Plant Biol.*, **1**, 498–503.

Trojer, P. and Reinberg, D. (2007) Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol. Cell*, **28**, 1–13.

Tsukada, Y. (2012) Hydroxylation mediates chromatin demethylation. *J. Biochem.*, **151**, 229–46.

Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M.E., Borchers, C.H., Tempst, P. and Zhang, Y. (2006) Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature*, **439**, 811–6.

5. BIBLIOGRAPHIE

Tsukada, Y., Ishitani, T. and Nakayama, K.I. (2010) KDM7 is a dual demethylase for histone H3 Lys 9 and Lys 27 and functions in brain development. *Genes Dev.*, **24**, 432–7.

Tu, S., Teng, Y.-C., Yuan, C., Wu, Y.-T., Chan, M.-Y., Cheng, A.-N., Lin, P.-H., Juan, L.-J. and Tsai, M.-D. (2008) The ARID domain of the H3K4 demethylase RBP2 binds to a DNA CCGCCC motif. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 419–21.

Tucker, M.R. and Laux, T. (2007) Connecting the paths in plant stem cell regulation. *Trends Cell Biol.*, **17**, 403–10.

Unnikrishnan, A., Gafken, P.R. and Tsukiyama, T. (2010) Dynamic changes in histone acetylation regulate origins of DNA replication. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 430–7.

Upadhyay, A.K., Horton, J.R., Zhang, X. and Cheng, X. (2011) Coordinated methyl-lysine erasure: structural and functional linkage of a Jumonji demethylase domain and a reader domain. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1**, 1–11.

Vaillant, I. and Paszkowski, J. (2007) Role of histone and DNA methylation in gene regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **10**, 528–33.

Vastenhouw, N.L. and Schier, A.F. (2012) Bivalent histone modifications in early embryogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **24**, 374–86.

Vaucheret, H. (2008) Plant ARGONAUTES. *Trends Plant Sci.*, **13**, 350–8.

Veiseth, S. V, Rahman, M. a, Yap, K.L., Fischer, A., Egge-Jacobsen, W., Reuter, G., Zhou, M.-M., Aalen, R.B. and Thorstensen, T. (2011) The SUVR4 histone lysine methyltransferase binds ubiquitin and converts H3K9me1 to H3K9me3 on transposon chromatin in Arabidopsis. *PLoS Genet.*, **7**, e1001325.

Veit, B. (2009) Hormone mediated regulation of the shoot apical meristem. *Plant Mol. Biol.*, **69**, 397–408.

Voinnet, O. (2009) Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, **136**, 669–87.

Voinnet, O. and Baulcombe, D.C. (1997) Systemic signalling in gene silencing. *Nature*, **389**, 553.

Wang, H., Lee, M.M. and Schiefelbein, J.W. (2002) Regulation of the cell expansion gene RHD3 during Arabidopsis development. *Plant Physiol.*, **129**, 638–49.

Wang, X., Duan, C.-G., Tang, K., et al. (2013) RNA-binding protein regulates plant DNA methylation by controlling mRNA processing at the intronic heterochromatin-containing gene IBM1. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

Webby, C.J., Wolf, A., Gromak, N., et al. (2009) Jmjd6 catalyses lysyl-hydroxylation of U2AF65, a protein associated with RNA splicing. *Science*, **325**, 90–3.

Wen, H., Li, J., Song, T., Lu, M., Kan, P.-Y., Lee, M.G., Sha, B. and Shi, X. (2010) Recognition of histone H3K4 trimethylation by the plant homeodomain of PHF2 modulates histone demethylation. *J. Biol. Chem.*, **285**, 9322–6.

Whetstine, J.R., Nottke, A., Lan, F., et al. (2006) Reversal of Histone Lysine Trimethylation by the JMJD2 Family of Histone Demethylases. *Cell*, **125**, 467–481.

Wierzbicki, A.T., Haag, J.R. and Pikaard, C.S. (2008) Noncoding transcription by RNA polymerase Pol IVb/Pol V mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes. *Cell*, **135**, 635–48.

Wierzbicki, A.T., Ream, T.S., Haag, J.R. and Pikaard, C.S. (2009) RNA polymerase V transcription guides ARGONAUTE4 to chromatin. *Nat. Genet.*, **41**, 630–4.

Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V and Provart, N.J. (2007) An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One*, **2**, e718.

Woodfield, D., Holland, J., Kojis, W. and Bingham, E. (2006) Growth Analysis of Medicago sativa ssp falcata and Medicago sativa ssp sativa - 06_04_GAS_Study.pdf. *Medicago Genet. Rep.*

Xiao, J., Zhang, H., Xing, L., Xu, S., Liu, H., Chong, K. and Xu, Y. (2013) Requirement of histone acetyltransferases HAM1 and HAM2 for epigenetic modification of FLC in regulating flowering in Arabidopsis. *J. Plant Physiol.*, **170**, 444–51.

Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, S.E. and Carrington, J.C. (2004) Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol.*, **2**, E104.

Xu, L., Zhao, Z., Dong, A., Soubigou-Taconnat, L., Renou, J.-P., Steinmetz, A. and Shen, W.-H. (2008) Di- and tri- but not monomethylation on histone H3 lysine 36 marks active transcription of genes involved in flowering time regulation and other processes in Arabidopsis thaliana. *Mol. Cell. Biol.*, **28**, 1348–60.

Xu, Y. and Price, B.D. (2011) Chromatin dynamics and the repair of DNA double strand breaks. *Cell Cycle*, **10**, 261–7.

Yamane, K., Toumazou, C., Tsukada, Y., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wong, J. and Zhang, Y. (2006) JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell*, **125**, 483–95.

Yang, H., Han, Z., Cao, Y., et al. (2012) A companion cell-dominant and developmentally regulated H3K4 demethylase controls flowering time in Arabidopsis via the repression of FLC expression. *PLoS Genet.*, **8**, e1002664.

Yang, H., Mo, H., Fan, D., Cao, Y., Cui, S. and Ma, L. (2012) Overexpression of a histone H3K4 demethylase, JMJ15, accelerates flowering time in Arabidopsis. *Plant Cell Rep.*, **31**, 1297–308.

Yang, W., Jiang, D., Jiang, J. and He, Y. (2010) A plant-specific histone H3 lysine 4 demethylase represses the floral transition in Arabidopsis. *Plant J.*, **62**, 663–73.

Yao, X., Feng, H., Yu, Y., Dong, A. and Shen, W.-H. (2013) SDG2-mediated H3K4 methylation is required for proper Arabidopsis root growth and development. *PLoS One*, **8**, e56537.

Ye, R., Wang, W., Iki, T., Liu, C., Wu, Y., Ishikawa, M., Zhou, X. and Qi, Y. (2012) Cytoplasmic assembly and selective nuclear import of Arabidopsis Argonaute4/siRNA complexes. *Mol. Cell*, **46**, 859–70.

Yoo, B.-C., Kragler, F., Varkonyi-Gasic, E., Haywood, V., Archer-Evans, S., Lee, Y.M., Lough, T.J. and Lucas, W.J. (2004) A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell*, **16**, 1979–2000.

Yu, C.-W., Liu, X., Luo, M., Chen, C., Lin, X., Tian, G., Lu, Q., Cui, Y. and Wu, K. (2011) HISTONE DEACETYLASE6 interacts with FLOWERING LOCUS D and regulates flowering in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **156**, 173–84.

Yu, X., Li, L., Li, L., Guo, M., Chory, J. and Yin, Y. (2008) Modulation of brassinosteroid-regulated gene expression by Jumonji domain-containing proteins ELF6 and REF6 in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **105**, 7618–23.

Yuan, G.-C., Liu, Y.-J., Dion, M.F., Slack, M.D., Wu, L.F., Altschuler, S.J. and Rando, O.J. (2005) Genome-scale identification of nucleosome positions in S. cerevisiae. *Science*, **309**, 626–30.

Yue, M., Li, Q., Zhang, Y., Zhao, Y., Zhang, Z. and Bao, S. (2013) Histone H4R3 Methylation Catalyzed by SKB1/PRMT5 Is Required for Maintaining Shoot Apical Meristem. *PLoS One*, **8**, e83258.

Zemach, A., Kim, M.Y., Hsieh, P.-H., Coleman-Derr, D., Eshed-Williams, L., Thao, K., Harmer, S.L. and Zilberman, D. (2013) The Arabidopsis nucleosome remodeler DDM1 allows DNA methyltransferases to access H1-containing heterochromatin. *Cell*, **153**, 193–205.

Zhang, C.-J., Zhou, J.-X., Liu, J., et al. (2013) The splicing machinery promotes RNA-directed DNA methylation and transcriptional silencing in Arabidopsis. *EMBO J.*, **32**, 1128–40.

Zhang, H., Bishop, B., Ringenberg, W., Muir, W.M. and Ogas, J. (2012) The CHD3 remodeler PICKLE associates with genes enriched for trimethylation of histone H3 lysine 27. *Plant Physiol.*, **159**, 418–32.

Zhang, H., Ma, Z.-Y., Zeng, L., et al. (2013) DTF1 is a core component of RNA-directed DNA methylation and may assist in the recruitment of Pol IV. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **110**, 8290–5.

Zhang, K., Sridhar, V. V, Zhu, J., Kapoor, A. and Zhu, J.-K. (2007) Distinctive core histone post-translational modification patterns in Arabidopsis thaliana. *PLoS One*, **2**, e1210.

Zhang, X., Bernatavichute, Y. V, Cokus, S., Pellegrini, M. and Jacobsen, S.E. (2009) Genome-wide analysis of mono-, di- and trimethylation of histone H3 lysine 4 in Arabidopsis thaliana. *Genome Biol.*, **10**, R62.

Zhang, X., Clarenz, O., Cokus, S., Bernatavichute, Y. V, Pellegrini, M., Goodrich, J. and Jacobsen, S.E. (2007) Whole-genome analysis of histone H3 lysine 27 trimethylation in Arabidopsis. *PLoS Biol.*, **5**, e129.

Zhao, Z. and Shen, W.-H. (2004) Plants contain a high number of proteins showing sequence similarity to the animal SUV39H family of histone methyltransferases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1030**, 661–9.

Zhao, Z., Yu, Y., Meyer, D., Wu, C. and Shen, W.-H. (2005) Prevention of early flowering by expression of FLOWERING LOCUS C requires methylation of histone H3 K36. *Nat. Cell Biol.*, **7**, 1256–60.

Zheng, Q., Rowley, M.J., Böhmdorfer, G., Sandhu, D., Gregory, B.D. and Wierzbicki, A.T. (2013) RNA polymerase V targets transcriptional silencing components to promoters of protein-coding genes. *Plant J.*

Zhou, W., Chen, H. and Zhang, L. (2009) The PcG protein hPc2 interacts with the N-terminus of histone demethylase JARID1B and acts as a transcriptional co-repressor. *BMB Rep.*, **42**, 154–9.

ANNEXES

Annexe 1 : ***Liste des oligonucléotides utilisés pour le génotypage***

Nom	Séquence	Tm
jmj24-5-3	ACACAAGCCACGACATGCAGG	71,0
jmj24-1-5	AAGAAAAGTATCCTGAACATGATAGG	61,7
jmj24-2-3	GCATTCATTCTAATCACTGAATCAC	62,8
jmj24-3-5	TCAATTTTGATGAAACTTGTGATTCAG	66,0
dcl3-1-F	AACCCATCACCATCCTGTAG	57,3
dcl3-1-R	GTGACTAGAAGAGGACTCAATGC	57,2
dcl2-1-F	AATAGGTCTTAATTGGAGTGTTGC	57,9
dcl2-1-R	TCAAATCTGATAACCAGGTTGC	59,1
dcl4-2t-F	GAAGCAGCTCATACGTCATCAG	60,0
dcl4-2t-R	GTATTCATGCACACAATTGATGAC	59,3
dcl4-2t-F2	TAGATGTTGTGGATCTTGTTGG	57,0
dcl4-2t-R2	TCTGCTGCACCTTTCTTCG	60,0
jmj14-1-f	TTGACTTGCTTCAAAACCGAG	60,0
jmj14-1-r	AAGACTCAGCATGGTTTCCAG	60,0
jmj15-1-5	ATACTCTCTTCTTAATGATTGAAGG	56,4
jmj15-2-3	CAGCTCGATAAACCGGGACTCC	64,0
jmj15-3-5	TCCATCTCTGAAACTCAACC	55,3
jmj15-4-3	TACGCTAGTGTCCTTGTCCT	57,3
jmj15-7-5	TTAAGTCCCTCTCAGCACAT	55,0
jmj15-8-3	ATTCTCATTGGATCTTGCAC	55,0
jmj19-1-5	TTCGGATCTCACTTCGTCCGGG	64,0
jmj19-2-3	AAAGAAATCTAATGTCAAGTATAAACC	55,9
jmj19-3-3	TCTTCGGTTGGGTTGAACACAGG	62,4
jmj20-1-5	TGAGTGCATTCAAGAACCCGGTG	62,4
jmj20-2-3	AGAGGAAGAAATCATTTAAATTCATTC	55,9

Annexe 2 : ***Liste des oligonucléotides utilisés pour les expériences de qPCR et RT-PCR***

Nom	Séquence	Tm	Utilisation
qDCL2-F	TTTGGGATGACTGCTTCACTT	59,7	qPCR
qDCL2-R	GCTCGTTTGGGACTTGGTATT	60,4	qPCR
qDCL3-F	TTGTGGAGAGTATCGCTGGA	49,4	qPCR
qDCL3-R	ATCGTGGCTTGTGCTTTGAC	61,2	qPCR
qDCL4-F	ATCAGCGACGAAAAAGGATG	60,2	qPCR
qDCL4-R	CGGATGGGAGGTTGTTATGT	59,7	qPCR
qAtCAF1i-F	CAAAGCCATACCACTTGAAACC	60,8	qPCR
qAtCAF1i-R	GAACTCGGAAATACTGCGAAA	49,4	qPCR
qORG1-F	GGAGGTCAACAATGAAACCA	58,4	qPCR
qORG1-R	CGAAACCAAACCCATCAAAC	60,2	qPCR
qSPL14-F	CCTGGCTGTGTTGTTCTATCTG	59,8	qPCR
qSPL14-R	CGAGTTGTCTTCCCGTGTT	58,7	qPCR
qATGCN4-F	TTTCGTTTCGTCGTTTGTTC	58,8	qPCR
qATGCN4-R	TGAGCCCTTCTTCGGTTTATC	60,6	qPCR
qHAP5B-F	GCAACAGGGAGTGATGGATT	59,9	qPCR
qHAP5B-R	TAGGGGAAGGGTGTGGTTCT	60,7	qPCR
qATABC1-F	TCCGTGGCATTGACTAATAAC	57,6	qPCR
qATABC1-R	TACTCGCTTCGTGCTCTACTTTC	60,2	qPCR
qATRFNR1-F	TCGTCTCTTTTCTCCATTGCT	59,1	qPCR
qATRFNR1-R	GGATTTGCTTGATTGCTGAA	58,8	qPCR
qAT4G10890-F	ACAGCCCCCTCAAGATTACA	59,5	qPCR
qAT4G10890-R	CACCGACGCCTGACATAAC	60,1	qPCR
qESM1-F	GCCAAACAACATAACGGAAA	58,5	qPCR
qESM1-R	CAACACCGCAACACGAAG	59,9	qPCR
q_AtCHL-F	CGATTTCCCACCATTCCTTT	55,3	qPCR
q_AtCHL-R	GGATTTGGCGTCCTTGAGT	56,7	qPCR
q_4g10270-F	ATGGACAGTGGCAGTGAGC	59,8	qPCR
q_4g10270-R	GCGGAGACAGAAGACGAAGA	60,7	qPCR
q_SEP4-F	GAGGATGGGAAGAGGGAAAG	60,0	qPCR
q_SEP4-R	CGGTTAGAGAAAATGAGAAGAGCA	61,2	qPCR
q_5g27410-F	GCACCTTACCTCCTCCCAGT	60,5	qPCR
q_5g27410-R	AAACAGAAACCTTCGCCATC	59,2	qPCR
q_1g33811-F	CGCTTACGGATTTGAGGTTG	60,6	qPCR
q_1g33811-R	AGATTTCGCCAGCAGTATGTT	58,9	qPCR
q_PDF2.2-F	CGAACTCTCTCTTTATCTCTCTTGC	59,4	qPCR
q_PDF2.2-R	AACCTATGGCTCTGCGACTC	59,5	qPCR
q_ERF104-F	GGATGTGGGAGCAGGAGAT	60,0	qPCR
q_ERF104-R	GAGTGACGCAAGTGAAAACG	59,5	qPCR
qCAF1-R	GAACTCGGAAATACTGCGAAA	59,4	qPCR
qORG1-F	GGAGGTCAACAATGAAACCA	58,4	qPCR
qORG1-R	CGAAACCAAACCCATCAAAC	60,2	qPCR

Annexe 3 : ***Liste des oligonucléotides utilisés pour les expériences de qPCR et RT-PCR (suite et fin)***

Nom	Séquence	Tm	Utilisation
qSPL14-F	CCTGGCTGTGTTGTTCTATCTG	59,8	qPCR
qSPL14-R	CGAGTTGTCTTCCCGTGTT	58,7	qPCR
qATGCN4-F	TTTCGTTTCGTCGTTTGTTC	58,8	qPCR
qATGCN4-R	TGAGCCCTTCTTCGGTTTATC	60,6	qPCR
qHAP5B-F	GCAACAGGGAGTGATGGATT	59,9	qPCR
qHAP5B-R	TAGGGGAAGGGTGTGGTTCT	60,7	qPCR
qATABC1-F	TCCGTGGCATTGACTAATAAC	57,6	qPCR
qATABC1-R	TACTCGCTTCGTGCTCTACTTTC	60,2	qPCR
qATRFNR1-F	TCGTCTCTTTTCTCCATTGCT	59,1	qPCR
qATRFNR1-R	GGATTTGCTTGATTGCTGAA	58,8	qPCR
qAT4G10890-F	ACAGCCCCCTCAAGATTACA	59,5	qPCR
qAT4G10890-R	CACCGACGCCTGACATAAC	60,1	qPCR
qHARBINGER-F	ATCTTTTTCCCCTCATCCATC	59,2	qPCR
qHARBINGER-R	ATCCTCCATTTTGCTTTCCA	59,5	qPCR
qESM1-F	GCCAAACAACATAACGGAAA	58,5	qPCR
qESM1-R	CAACACCGCAACACGAAG	59,9	qPCR
qDCL2-F	TTTGGGATGACTGCTTCACTT	59,7	qPCR
qDCL2-R	GCTCGTTTGGGACTTGGTATT	60,4	qPCR
qDCL3-F	TTGTGGAGAGTATCGCTGGA	59,4	qPCR
qDCL3-R	ATCGTGGCTTGTGCTTTGAC	61,2	qPCR
qDCL4-F	ATCAGCGACGAAAAAGGATG	60,2	qPCR
qDCL4-R	CGGATGGGAGGTTGTTATGT	59,7	qPCR
q_jmj24-for	TGTTTACCAAACGACCACGA	55,3	qPCR
q_jmj24-rev	AAATCCAAGCTCTGCTCCAA	55,3	qPCR
q_jmj24-F2	TGGCAATGGTGAGTCTATTCC	57,9	qPCR
q_jmj24-R2	CCTTTTCGCTTTCTTCTGGTT	55,9	qPCR
q_jmj24-F3	TGCCAGAGAAAAGATAGAGAGAGA	59,3	qPCR
q_jmj24-R3	AATCACACAAGCCACGACA	54,5	qPCR
CKX3-A3	CTCGGCTAAAGACGGAGTTG	60,0	RT-PCR
CKX3-A2	TCAAAAGCCTCCCAATTGTC	60,1	RT-PCR
CKX5-A1	GCACGAATCTCTCTCGAACC	60,0	RT-PCR
CKX5-A2	AAATTCTTGGACCGGAGCTT	60,1	RT-PCR
CUC1-F	CCAACGGGACTGAGAACGAACA	66,7	RT-PCR
CUC1-R	CGGTGGAGCGGGAAGGAAT	66,8	RT-PCR
RT-EVD-F	GACCTGACATTTGTTTTGCG	59,2	RT-PCR
RT-EVD-R	GGTGAAGATATCCGCCAAC	57,9	RT-PCR

Annexe 4 : ***Liste des oligonucléotides utilisés pour les expériences de bisulfite***

Nom	Séquence	Tm
AT3G16950-tF1	AAAAGGTTAAATATGGGAAGGA	56,0
AT3G16950-tR1	CTTTCTTRRATTTATCAAAACCCTCT	N/A
AT3G16950-tF2	GTAAATAGTAGAAAATAAGATTTTAAGG	52,2
AT3G16950-tR2	CACAAATCTTCCCAATTCA	54,5
AT4G35270-F1	TGYTTYAAGGGGAAGGYATTGTAGGAA	N/A
AT4G35270-R1	TTCTCTRCAAAAACAACTTCCTCTCTAAC	N/A
AT4G35270-F2	GTTAGAGAGGAAGTTGTTTTTGYAGAGAA	N/A
AT4G35270-R2	TCTTTTCTRTTTTTRTTCTTCTCTTCTCAC	N/A
AT1G52410-tF1	TTTYTTGATTYTATTTTTGTTATGTTT	N/A
AT1G52410-tR1	ARAAAATCTTACATAATTCTTCATC	N/A

Annexe 5 : ***Liste des tampons utilisés pour les expériences de ChIP***

Extraction buffer 1	Concentration finale
Sucrose	0.4 M
Tris-HCl, pH=8	10 mM
β-mercapto	5 mM
PMSF	0.1 mM
protease inhibitors	1x

Extraction buffer 2	Concentration finale
sucrose	0.25 M
Tris-HCl, pH=8	10 mM
MgCl2	10 mM
Triton X-100	1%
β-mercapto	5 mM
PMSF	0.1 mM
protease inhibitors	1 x

Extraction buffer 3	Concentration finale
sucrose	1.7 M
Tris-HCl, pH=8	10 mM
MgCl2	2 mM
Triton X-100	0.15 %
β-mercapto	5 mM
PMSF	0.1 mM
protease inhibitors	1 x

Nuclei lysis buffer	Concentration finale
Tris-HCl, pH=8	50 mM
EDTA	10 mM
SDS	1%
PMSF	0.1 mM
protease inhibitors	1 x

ChIP dilution buffer	Concentration finale
Triton X-100	1.1%
EDTA	1.2 mM
Tris–HCl, pH 8.0	16.7 mM
NaCl	167 mM
PMSF	0.1 mM
protease inhibitors	1 x

Annexe 5 : ***Liste des tampons utilisés pour les expériences de ChIP (suite et fin)***

Low salt wash buffer	Concentration finale
NaCl	150 mM
SDS	0.1%
Triton X-100	0,01
EDTA	2 mM
Tris–HCl, pH 8.0	20 mM

High salt wash buffer	Concentration finale
NaCl	500 mM
SDS	0.1%
Triton X-100	0,01
EDTA	2 mM
Tris–HCl, pH 8.0	20 mM

LiCl wash buffer	Concentration finale
LiCl	0.25 M
NP-40	0,01
sodium deoxycholate	0,01
EDTA	1 mM
Tris–HCl, pH 8.0	10 mM

TE buffer	Concentration finale
Tris–HCl, pH 8.0	10 mM
EDTA	1 mM

Elution buffer	Concentration finale
SDS	0,01
NaHCO3	0.1 M

Annexe 6 : ***Liste des oligonucléotides utilisés pour les expériences de ChIP***

Nom	Séquence	Tm
c_AtCHL-F1	GTTGTCGGCACCAATCATAC	58,9
c_AtCHL-R1	AAATGCAAAATTCAAAGAAATAGTG	58,0
c_AtCHL-F2	GCCATGCACTAATCACATCG	60,1
c_AtCHL-R2	AAGTGTTGACAGGTTGGGAGA	59,6
c_AtCHL-F3	TTTGCCAACTAGGGAGTGCT	59,9
c_AtCHL-R3	CAGTCATGCCTCTCATCATCA	59,8
c_1g33811-F1	CAGTGTGGGAAAGTTTTGGAA	60,0
c_1g33811-R1	CAGTCTCGTGAGGGTCTCAG	58,5
c_1g33811-F2	CGACAATGGAAACAACAATAGG	59,4
c_1g33811-R2	TCGCAAGAGAAAGCAACC	57,6
c_SEP4-F1	TTCCCTGATGAAGTAAGACTAAAATAA	58,1
c_SEP4-R1	GCCAAATAAATGCTTCCAAA	57,8
c_PDF2.2-F1	ACTCCACAACATCCGCAAA	60,1
c_PDF2.2-R1	AAGGTGACAAGACACGCAGA	59,5

RÉSUMÉ

Cette dernière décennie a vu augmenter le nombre d'études portant sur la caractérisation des protéines JUMONJI (JMJ) et montrant leur rôle prépondérant dans la régulation des gènes et le développement des organismes. Ces protéines sont capables de déméthyler certains résidus des queues des histones et ont été organisées en groupes phylogénétiques en fonction de la conservation de leur domaine catalytique. Pour chaque clade entre un et trois substrats spécifiques ont pu être identifiés. De la sous-famille KDM3, dont le résidu cible est H3K9, seul un membre, *IBM1*, a été caractérisé chez *Arabidopsis*. Cette étude montre que la mutation de *JMJ24*, un autre membre de ce groupe, entraine une augmentation de la taille des racines, cotylédons et organes floraux, suggérant un rôle dans le contrôle du développement à différents stades. De plus, l'analyse de l'expression tissulaire indique que *JMJ24* est exprimé dans le phloème, en cohérence avec l'effet pléiotropique de sa mutation. Enfin, nos données suggèrent une interaction entre JMJ24 et d'autres protéines JMJ, telles JMJ14 et IBM1, mais aussi une interaction avec les protéines DCL, impliquées dans la régulation des gènes et des éléments transposables.

ABSTRACT

Numerous studies over the last decade have reported the characterization of the JUMONJI (JMJ) proteins, showing their critical importance in regulating genes and organism's development. These proteins are able to demethylate a subset of histone tail residues and were clustered into distinct groups using a phylogenetic analysis based on their catalytic domain conservation. Furthermore, modification of one to three specific residues has been attributed to each JMJ group. Within the KDM3 subfamily, of which target is the H3K9 residue, only one member, *IBM1*, was first characterized in *Arabidopsis*. In this report, we showed that the mutation of *JMJ24*, another member of this subfamily, resulted in an increase of the root length, cotyledon and floral organ size, suggesting that JMJ24 functions is needed at different developmental stage. In addition, the analysis of the tissue-specific expression of *JMJ24* indicated that the gene is expressed within the phloem of all organs, correlating with the pleiotropic effect of the gene mutation. Last, our data also suggested that JMJ24 interacts with other JMJ protein like JMJ14 and IBM1, but also with the DCL proteins knowing to be involved in genes and transposable elements regulation.