

## **Analyse fonctionnelle d'*Arabidopsis* modification de la chromatine et de remodelage de réglementation (CHR5 et JMJ15) dans l'expression des gènes**

Remodelage de la chromatine et modification de l'histone jouent des rôles importants dans la mise en place et la régulation dynamique des états de l'expression des gènes. L'unité de base de la chromatine est le nucléosome, constitué de 147 pb de l'ADN double brin super-hélicoïdale enroulé autour d'un octamère d'histones. Nucléosomes dans la plupart des gènes sont organisés en gros le même schéma: une région sans nucléosome (NFR) à proximité du site de démarrage de la transcription (TSS), flanqué de deux nucléosomes bien positionnés (les -1 et +1 nucléosomes) et suivie par des nucléosomes positionnés de façon régulière tout au long du gène. Remodelage de la chromatine consiste à modifier contacts histone-ADN, déplacer les nucléosomes, et échanger des histones ou retirer les nucléosomes entiers. Processus de remodelage de la chromatine est médiée par une grande famille d'enzymes contenant les protéines SWI/SNF, et d'une manière dépendante de l'énergie. Modification de l'histone H3 qui en particulier est liée à l'activité des gènes. Par exemple, l'acétylation des lysines de l'histone est généralement impliquée dans l'activation de gènes, cependant la méthylation des lysines de l'histone peut avoir un effet positif ou négatif sur

l'expression des gènes. La tri-méthylation de l'histone H3 lysine 4 (H3K4me3) est enrichie à l'extrémité 5' de gènes activement transcrits, tandis que la tri-méthylation de l'histone H3 lysine 27 (H3K27me3) marque les gènes réprimés qui sont sensibles au stress ou impliqués dans le développement. La méthylation des histones est réversible, ce qui est contrôlée par les méthyltransférases des histones (HMT) et les déméthylases des histones (HDM). Mon travail de thèse concerne l'analyse fonctionnelle d'une chromodomaine/ hélicase /liaison à l'ADN 1 (CHD1) d'*Arabidopsis*, dite CHR5 et un gène d'histone H3K4 déméthylase appelé JMJ15 dans la régulation de la structure de la chromatine et la modification des histones qui contrôlent l'expression de gènes végétaux sensibles au stress et impliqués dans le contrôle du développement.

Les remodelleurs de la chromatine ont une composition diverse, mais ils partagent tous la présence d'une sous-unité qui appartient à la sous famille SNF2 des ATPases, parmi lesquels le chromodomaine, hélicase / ATPase et le domaine de liaison à l'ADN (CHD). Outre *Saccharomyces cerevisiae* qui a une seule protéine de CHD (CHD1), d'autres eucaryotes supérieurs ont plusieurs membres CHD qui sont divisés en sous-famille des I, II et III. Les protéines CHD1 sont impliquées dans l'expression génique à différents niveaux. Des résultats récents suggèrent que les protéines CHD1 ont deux

fonctions, dont une est de remodeler la chromatine pour diriger le positionnement des nucléosomes requis pour la transcription des gènes. En plus des doubles chromodomains et l'hélicase/ATPase, les protéines CHD3 contiennent un ou deux Plant Homéodomains (PHD) à l'extrémité N-terminale. Les protéines CHD3 chez *Drosophila melanogaster* et des cellules de mammifères sont les éléments centraux du complexe Nucléosome Remodeling et histone désacétylases (NuRD) ou Mi-2 régissant la répression transcriptionnelle. Cependant, d'autres études ont révélé que les protéines de CHD3 peuvent également fonctionner comme un co-activateur transcriptionnel. Plusieurs protéines de CHD3 sont identifiées dans les plantes. La protéine *Arabidopsis* CHD3 appelée PICKLE (PKL) a d'abord été identifiée pour réprimer des traits embryonnaires après la germination des graines. La fonction de PKL est pour réprimer la transcription des gènes d'identité de l'embryon comme *LEAFY COTYLEDON1 (LEC1)*, *LEAFY COTYLEDON 2 (LEC2)*, *ABA INSENSIBLES 3 (ABI3)*, et *FUSCA3 (FUS3)*. Contrairement aux protéines CHD3 animales, PKL a une fonction pour promouvoir la H3K27me3 sur des gènes cibles plutôt que la désacétylation des histones. En revanche, un seul gène de la protéine analogue à CHD1 a été trouvé dans le génome d'*Arabidopsis* ou de riz. La fonction des gènes de CHD1 dans l'expression des gènes et le développement de la plante n'est pas étudiée.

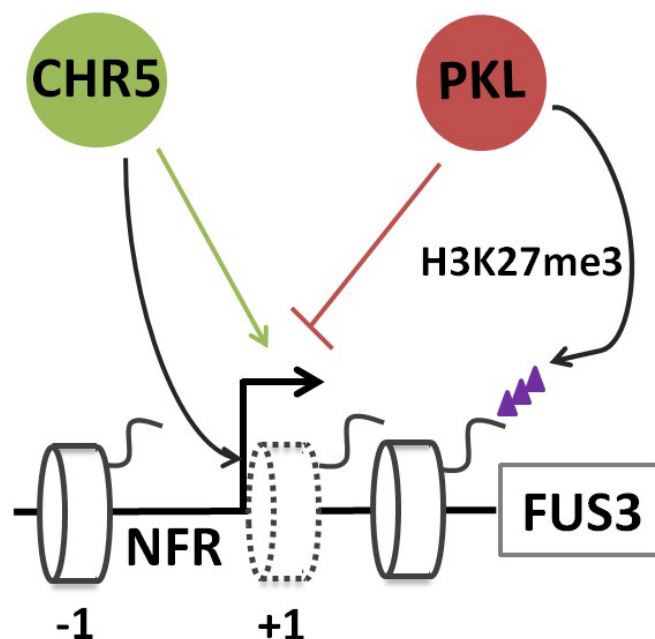
Dans la première partie, nous avons étudié la fonction des gènes d'*Arabidopsis* CHD1, CHR5, dans la régulation des gènes de l'embryon et de la maturation des graines. Tout d'abord, nous avons analysé le profil d'expression de CHR5 dans le développement de la plante. Le résultat a révélé que l'expression CHR5 est activée pendant le développement des graines et est restée à être exprimée dans le développement des organes / tissus. En particulier, CHR5 commence à s'exprimer à au stade globulaire triangulaire et son expression augmente progressivement jusqu'à la maturité de l'embryon. Pour étudier la fonction de CHR5 dans l'expression des gènes et le développement des plantes, nous avons caractérisé des lignées d'insertion d'ADN-T d'*Arabidopsis* dans les écotypes Colombie-0 (Col-0) et Wassilewskija (Ws). L'analyse de mutants a révélé que la perte de fonction de CHR5 diminue le niveau de gènes clés de maturation d'embryon tels que *LEC1*, *ABI3* et *FUS3* pendant le développement de la graine. En outre, l'expression des gènes de protéines de stockage de graines (c'est-à-dire 2S2, 7S1, OLE1 et CRA1) qui sont des cibles en aval de LEC1 et AFL, a également été réduite chez les mutants *chr5*. Pour confirmer les données, nous avons analysé l'accumulation des protéines de stockage des graines par SDS-PAGE. Le résultat a révélé une diminution de l'albumine 2S et 12S globuline dans les graines matures des mutants par rapport au type sauvage (Col-0). Ces

données suggèrent que CHR5 est impliqué dans l'expression des gènes de l'embryon et de la maturation des graines chez *Arabidopsis*. La mutation *pickle* (*pk1*) a été identifiée due à la production d'un phénotype de dé-répression des gènes régulateurs de l'embryon chez les jeunes plantes et des traits embryonnaires dans la racine primaire de semis, l'accumulation de réserves de stockage des semences dans la plantule, et la formation d'embryons somatiques. Pour étudier l'interaction fonctionnelle entre CHR5 et PKL, nous avons généré de doubles mutants *chr5 pk1*. La pénétrance des racines embryonnaires dans *pk1* (environ 15%), révélée par un colorant rouge Fat coloration des acides gras présents dans les racines embryonnaires, a été diminuée de manière significative à environ 5% dans les doubles mutants. L'expression ectopique de *LEC1*, *ABI3*, et *FUS3* dans les semis ou les racines des plantules *pk1* a été supprimée dans les doubles mutants, suggérant des actions antagonistes des deux protéines CHD sur l'expression de *LEC1*, *ABI3* et *FUS3*. De même, l'expression de *LEC1*, *ABI3* et *FUS3* dans les siliques des doubles mutants était inférieure à celle dans *pk1*, supportant l'idée que CHR5 et PKL ont une fonction inverse pour régler le programme de l'expression des gènes de la maturation des graines. Nous avons ensuite étudié si les mutations *chr5* et *pk1* affectés l'activité du promoteur et le profil d'expression des gènes régulateurs de l'embryon au cours du développement de l'embryon.

En raison du profil d'expression similaire avec des CHR5, ABI3 et FUS3, nous avons choisi la région du promoteur d'ABI3 et de FUS3 (avec 5'-UTR) pour contrôler l'expression de GUS dans des plantes transgénique de type sauvage, et dans *chr5* et *pk1* simples et doubles mutants. Le résultat a montré que les mutations ne modifient pas clairement le profil d'expression au cours du développement embryonnaire. La quantification des transcrits de GUS dans les siliques à l'étape 6, a indiqué que l'activité du promoteur des deux gènes a été réduite chez *chr5*, a augmenté chez *pk1* et présentait un niveau intermédiaire dans les mutants doubles. Ces résultats confirment les données ci-dessus et a révélé que CHR5 et PKL agissent de manière antagoniste pour réguler l'activité de promoteur de *ABI3* et *FUS3* dans le développement de l'embryon. Pour étudier si CHR5 régule directement l'activité de promoteur des gènes de l'embryon, on a isolé à partir de tissus de la chromatine des siliques de plantes *chr5* complémentées par *pCHR5-CHR5-HA*. Les fragments de chromatine ont été immuno-précipités à l'anti-HA et analysé par qPCR. L'analyse a révélé que seules les régions en amont ou à proximité du site d'initiation de la transcription (TSS), et non les parties du corps de gène, d'*ABI3* et de *FUS3* ont été clairement enrichis dans les fractions précipitées, ce qui indique que CHR5 est directement associée à la région du promoteur d'*ABI3* et de *FUS3*. Pour étudier comment CHR5 a affecté l'expression des

gènes *LEC1/AFL*, nous avons d'abord analysé la modification des histones de ces gènes au cours du développement des graines dans des mutants de *CHR5*. Le résultat a révélé que la quantité d'H3K4me3 n'a pas été clairement modifiée dans les mutants de *chr5*, cependant une augmentation d'H3K27me3 (environ 2 fois) de ces gènes a été détectée chez les mutants *chr5* par rapport au type sauvage. Nous avons également analysé la méthylation des histones dans les plantes *chr5* et *pk1*. Dans les semis de *pk1* qui expriment de façon ectopique des gènes *LEC1* et *AFL*, H3K27me3 a été réduite sur *LEC1* et *LEC2*, mais pas sur *ABI3* et *FUS3*. Contrairement aux graines en développement, la mutation de *chr5* n'a pas conduit à un changement clair d'H3K27me3 sur les gènes de la maturation des graines de semis. En outre, la diminution d'H3K27me3 sur *LEC1* et *LEC2* dans *pk1* a été maintenue dans les doubles mutants *chr5 pk1*, ce qui suggère que la fonction antagoniste de *CHR5* et *PKL* sur l'expression des gènes dans les semis ne peut pas s'appuyer sur la régulation de niveau d'H3K27me3. Des résultats récents ont montré que la protéine *CHD1* est impliquée dans le positionnement des nucléosomes et régule ainsi le taux de transcription. Pour étudier si *CHR5* a été impliquée dans la structure de la chromatine des gènes cibles, nous avons ensuite examiné le positionnement des nucléosomes et leur occupation dans la région TSS de *FUS3* en utilisant nucléase micrococcal (MNase) cartographie à la

haute résolution. Nos données montrent qu'une occupation nucléosomale relativement élevée de *FUS3* dans les plantules par rapport aux tissus siliques et que des mutations *chr5* conduisent à une occupation relativement élevée des nucléosomes situées à la proximité de la NFR de *FUS3* dans les tissus siliques, ce qui suggère que CHR5 peut avoir une fonction de réduire la barrière nucléosomale pour stimuler la transcription du gène *FUS3* au cours du développement de l'embryon. En général, nos données suggèrent que CHR5 est impliqué dans l'établissement de l'état d'activation des gènes régulateurs de l'embryon en réduisant la barrière nucléosomale et révèle le rôle programmatique de remodelage de la chromatine contrôlé par des protéines de CHD dans la régulation des gènes clés du développement dans les plantes (Figure 1).





**Figure 1 : Un modèle pour les protéines de CHD dans la régulation des gènes de l'embryon et la maturation des graines au cours de l'embryogenèse.**

Dans la deuxième partie, nous avons étudié l'expression et la fonction des protéines à JmjC-domaine telle que JMJ15 d'*Arabidopsis*. JMJ15 appartient au groupe KDM5 / JARID1, qui a été montrée précédemment comme une déméthylase d'H3K4. Cependant, on sait peu au sujet de sa fonction dans la régulation des gènes répondant au stress et à la croissance de la plante. Pour étudier le profil d'expression temporelle et spatiale du gène *JMJ15*, nous avons utilisé une région promotrice de *JMJ15* (-2051 à 14 pb par rapport à l'ATG) pour faire une construction de fusion traductionnelle avec le reporteur GUS et avons transformé des plantes d'*Arabidopsis* Col-0. Le résultat a montré que l'expression de JMJ15 est relativement faible et est limitée à un certain nombre de tissus au cours de la croissance végétative, tel que la base de feuilles de la rosette, les tissus vasculaires des racines, des cellules de péricycle à partir desquelles initient les méristèmes des racines latérales, et la base de la croissance latérale racines. Dans l'inflorescence, l'activité GUS a été fortement détectée dans les jeunes anthères et dans les carpelles, mais les activités deviennent plus faibles dans la fleur mature. Pour étudier la fonction de JMJ15 dans l'expression des gènes et le développement des plantes, nous avons caractérisé trois mutants d'insertion d'ADN-T: *jmj15-1*

et *jmj15-2* sont des mutants de gain de fonction, et *jmj15-3* est une mutation de perte-de-fonction. Le mutant *jmj15-3* n'affichait pas phénotypes évidentes, alors que les mutations de gain-de-fonction, *jmj15-1* et *jmj15-2*, réduisent la longueur de l'hypocotyle dans les semis et la hauteur de la plante au stade de maturité par rapport au type sauvage. Pour étudier si le phénotype de la hauteur des plantes de *jmj15-1* et *jmj15-2* était dû à une augmentation de l'expression du gène, nous avons construit *35S-JMJ15-HA* et obtenu des plantes transgéniques sur-exprimant JMJ15. Les plantes transgéniques montrent également un phénotype similaire avec la hauteur réduite. Le phénotype de la hauteur de la plante des mutants de gain-de-fonction nous a conduit à étudier davantage la structure de cellules de la tige. L'observation a révélé que la surexpression de JMJ15 a entraîné une augmentation de la teneur en lignine totale dans le système vasculaire de la tige en même temps que la réduction de la croissance de la tige. Pour déterminer l'effet de la surexpression JMJ15 dans l'expression des gènes, les transcriptomes de *jmj15-1*, *jmj15-2* et des plantes de type sauvages ont été analysés. Le résultat a révélé 23 gènes régulés à la hausse et 164 gènes régulés à la baisse à plus de 2 fois dans les deux lignées mutantes de surexpression par rapport au type sauvage. Le plus grand nombre de gènes régulés à la baisse par rapport à ceux régulés à la hausse suggère que l'expression de JMJ15 élevée

principalement réprime les gènes et que JMJ15 agit comme un répresseur transcriptionnel, compatible avec son activité de H3K4 déméthylase. Pour évaluer s'il y avait un enrichissement des gènes dérégulés pour H3K4me<sub>2/3</sub>, nous avons comparé les gènes dérégulés avec les H3K4me<sub>2/3/1</sub> au niveau génomique dans les données publiques obtenues à partir de plants de type sauvage. L'analyse a révélé que près de 83% des gènes régulés à la baisse ont été marqués par H3K4me<sub>3</sub>, H3K4me<sub>2</sub> ou H3K4me<sub>2/3</sub>, contre environ 52% des gènes régulés à la hausse. Environ 58% des gènes régulés à la baisse ont été marqués par la méthylation de H3K4 dans la région promotrice, comparativement à environ 32% des gènes régulés à la hausse. Par rapport à des gènes régulés à la hausse, ceux régulés à la baisse ont été clairement enrichi pour les doubles de méthylation H3K4me<sub>2/3</sub>. Cette analyse suggère que la répression génique contrôlée par JMJ15 pourrait être réalisée par la déméthylation H3K4 et a indiqué que JMJ15 préférentiellement réprime les gènes qui ont les doubles méthylations H3K4me<sub>2/3</sub>. L'ontologie génétique (GO) l'analyse des gènes dérégulés a révélé que près de 50% (82/164) des gènes régulés à la baisse appartiennent aux catégories sensibles au stress. Nous avons remarqué que parmi les gènes les plus fortement régulés à la baisse, d'environ 50% (15) encodent des facteurs de transcription, y compris la protéine de stress sensible à doigt de zinc *STZ/Zat10*, les protéines WRKY

sensibles au stress (*WRKY40* et *WRKY33*), le facteur CBF2 sensible au froid, les protéines sensibles à l'éthylène *ATERF6* et *ATERF11*, la protéine F-box *ATFBS1* et les gènes de *CYP707A3* cytochrome P450, etc. Parmi ceux-ci, la diminution de l'expression de *WRKY33* et *ERF6* a été validée par RT-qPCR. Ce résultat indique que la sur-expression de JMJ15 réprime préférentiellement de gènes régulateurs de stress. Pour étudier si les mutations *jmj15* affectent la tolérance des plantes au stress, nous avons germé des graines de type sauvage et les mutants *jmj15-1*, *jmj15-2* et *jmj15-3* sur les milieux ½MS contenant 130mM ou 150mM de NaCl. Le phénotype de croissance des plantules a indiqué que les mutations de gain-de-fonction augmente la tolérance accrue de la plante au stress de sel, tandis que la mutation de perte –de-fonction a réduit la résistance au stress. Les données suggèrent que l'augmentation des niveaux JMJ15 peuvent réguler le programme de l'expression des gènes qui coordonne le maintien de croissance des plantes et améliore la tolérance au stress. Dans l'ensemble, mon travail de thèse a apporté quelques nouveaux éléments à la compréhension actuelle du fonctionnement des régulateurs de la chromatine dans l'expression des gènes de la plante.