



HAL
open science

Implication des protéines adaptatrices IMA et MIF2 dans le développement floral chez *Solanum lycopersicum* et *Arabidopsis thaliana*

Norbert Bollier

► **To cite this version:**

Norbert Bollier. Implication des protéines adaptatrices IMA et MIF2 dans le développement floral chez *Solanum lycopersicum* et *Arabidopsis thaliana*. Biologie végétale. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT: . tel-01520146v1

HAL Id: tel-01520146

<https://theses.hal.science/tel-01520146v1>

Submitted on 9 May 2017 (v1), last revised 1 Jun 2017 (v2)

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.

Thèse

présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Biologie Végétale

par

Norbert BOLLIER

Implication des protéines adaptatrices IMA et MIF2 dans le développement floral chez *Solanum lycopersicum* et *Arabidopsis thaliana*

Sous la direction de : Michel HERNOULD

Présentée et soutenue publiquement

le 2 décembre 2016

Membres du jury :

Président	M. MONGRAND Sébastien , Directeur de recherche (CNRS Bordeaux)
Rapporteurs	M. BENDAHMANE Abdelhafid , Directeur de recherche (INRA, IPS2) Mme PERILLEUX Claire , Professeur (Université de Liège)
Examineurs	Mme RAYNAUD Cécile , Chargée de recherche (CNRS, IPS2) M. TREHIN Christophe , Chargé de recherche (ENS, Lyon) Mme GONZALEZ Nathalie , Chargée de recherche (INRA, Bordeaux)
Directeur de thèse	M. HERNOULD Michel , Professeur (Université de Bordeaux)

*“We can only see a short distance ahead,
but we can see plenty there that needs to be done.”*

Alan Turing

Remerciements

Avant toute chose, j'adresse mes remerciements à Mesdames Claire Périlleux, Cécile Raynaud, Nathalie Gonzalez et Messieurs Sébastien Mongrand, Abdel Bendahmane, et Christophe Trehin pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse et pour le temps qu'ils y ont consacré.

Je remercie le ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche pour le financement de cette thèse.

Je remercie l'UMR 1332 Biologie du fruit et pathologie de m'avoir accueilli en son sein pour la réalisation de cette thèse et un j'adresse un grand merci à l'ensemble de ses membres pour leur aide tout au long de ce travail de thèse. Un grand merci aussi à l'ensemble des membres de l'administration qui m'ont accompagné dans toutes mes démarches, un merci tout particulier à Florence pour sa réactivité exemplaire, sa compréhension et son aide.

Bien évidemment un grand merci à Christian Chevalier, qui m'a accueilli dans son équipe à plusieurs reprises en tant que stagiaire puis en tant que doctorant et bientôt en tant que post-doctorant, merci pour votre bienveillance et votre savoir.

Avant d'en arriver là, le chemin a été long. Huit ans ont passé depuis que j'ai commencé à trainer dans les couloirs de l'INRA et les personnes à remercier sont nombreuses...

Le commencement. Biologie végétale 101 par Fred Gévaudant. Aussi loin que je me souviens, ce sont tes cours qui m'ont donné envie de continuer dans cette voie. Et comme je ne regrette rien, bien au contraire, je t'adresse un grand merci pour m'avoir transmis ta passion pour la biologie végétale et pour l'enseignement, si j'ai choisi cette voie tu y es pour quelque chose. Et un grand bravo parce qu'il en faut du talent pour accrocher un étudiant avec des mots comme glaucophytes, thalle siphonné, dialysépale ou parenchyme médullaire sclérifié !

Mes premiers pas. Le tout premier stage. Merci à Cécile Brès pour m'avoir accueilli pour la première fois au sein du laboratoire, pour m'avoir montré que faire de la recherche c'est aussi faire des manips et vivre au sein d'un labo.

La route est longue, mais le temps passe vite. Merci à Nathalie Frangne qui m'a accueilli pour mon second stage et m'a fait découvrir les joies et les peines de la microscopie et de la

biologie cellulaire. Merci aussi à David et Fatma Lecourieux avec qui j'ai fait mes premières armes en biologie moléculaire à l'autre bout du monde, l'ISVV.

Une étape, le master. Un très grand merci à Michel Hernould, vous avez joué bien des rôles pour moi avant celui de directeur de thèse. Vous avez été le conseiller d'orientation qui m'a mené vers ce master, et s'il y a un choix que je ne regrette pas, c'est bien celui-là. Vous êtes ensuite devenu le professeur référent, et votre passion pour l'enseignement fait de vous un bel exemple à suivre. Aujourd'hui, votre statut de directeur de thèse va prendre fin mais il ne fait aucun doute que votre savoir encyclopédique et votre bienveillance se traduira encore par une sollicitation qui durera de nombreuses années. Of course, je remercie Fred Delmas, à qui je dois mon retour dans l'équipe alors que je m'étais égaré au pays des caribous. Toujours présent à l'heure de l'hypoglycémie, tu m'as appris beaucoup de chose autour d'un granola ou d'un pépito et je te dois à peu près tout ce que je sais sur Arabido et sur la chasse au thrips. Merci pour ta disponibilité et tes idées, j'ai sûrement passé plus de temps dans le bureau des Freds que dans le bureau des doctorants et je vous dois beaucoup de mes choix.

Enfin, la thèse. Merci à tous ceux qui sont intervenus de près ou de loin dans la réalisation de cette thèse, en particulier mes amis pour m'avoir accompagné dans les joies et les peines de la vie de thésard. Merci à Noé, ou Luc pour plus d'inconvention, qui même expatrié à l'autre bout de l'INRA a continué à faire des manip à BFP rien que pour venir boire le café avec moi (ah non ?). Merci pour tous ces échanges autour du repas du midi ou d'une bière au V&B. Merci à JP (et Ade !) car les soirées (et les pizzas) sont et seront toujours un réconfort indispensable. Merci à Tratra pour ton soutien et pour nos discussions. Merci à tous les étudiants, stagiaires, thésards et ex-thésards qui ont partagé mes journées et soirées, Céline, Julien, William, Charlotte, Cécile, etc.

Bien sûr, toute ma gratitude revient à mes parents, ils m'ont laissé libre de mes choix, m'ont encouragé et m'ont permis d'en arriver là, merci à mon frère et ma sœur qui ont été un soutien lors de ces années.

Enfin, il n'y a pas de mots assez forts pour exprimer toute ma reconnaissance envers ma chérie, Fanny, qui partage ma vie depuis plus de 10 ans et qui a toujours été présente dans les bons et mauvais moments, et sans qui je n'en serai certainement pas là aujourd'hui.

Résumé

Implication des protéines adaptatrices IMA et MIF2 dans le développement floral chez *Solanum lycopersicum* et *Arabidopsis thaliana*

Les gènes *IMA* (*Inhibitor of Meristem Activity*) et *MIF2* (*Mini zinc Finger 2*) codent des protéines de la famille des « Mini zinc Finger » impliquées dans le développement et la réponse hormonale. Leur fonction est intimement liée à leur capacité d'interaction avec des protéines partenaires au travers de leur unique domaine, un doigt de zinc non-canonique. La génération et la caractérisation de plantes gain- et perte-de-fonction pour ces gènes chez *Solanum lycopersicum* et *Arabidopsis thaliana* nous a permis de mettre en évidence leur homologie fonctionnelle dans le mécanisme d'arrêt de la prolifération des cellules souches méristématiques : la terminaison florale. Au cours du développement floral précoce, leur expression est induite par le facteur de transcription à MADS-BOX AGAMOUS. Les protéines codées sont capables d'interagir avec le facteur de transcription à doigt de zinc C₂H₂ KNUCKLES (KNU) et de recruter le co-facteur TOPLESS (TPL) ainsi que l'HISTONE DEACETYLASE19 (HDA19) pour former un complexe multimérique impliqué dans le remodelage de la chromatine. Ce complexe intervient ensuite afin de réprimer l'expression du régulateur majeur de la prolifération des cellules souches méristématiques WUSCHEL. Les travaux qui ont suivi ont permis de montrer qu'au-delà de leur intervention dans ce processus, les protéines IMA et MIF2 sont impliquées d'une manière plus générale dans le développement floral et l'organogenèse. Leur fonction de protéine adaptatrice est sans doute permise par le désordre intrinsèque qui les caractérise et qui leur permettrait une spécificité d'interaction avec divers partenaires protéiques.

Mots-clés : *Arabidopsis*; tomate ; Mini Zinc Finger ; terminaison florale ; KNU ; Fruit

Abstract

Involvement of IMA and MIF2 adaptor proteins in floral development in *Solanum lycopersicum* and *Arabidopsis thaliana*

IMA (Inhibitor of Meristem Activity) and MIF2 (Mini zinc Finger 2) are two members of the Mini zinc Finger family (MIF) involved in the regulation of floral development and hormonal signaling pathways. Their ability to control physiological events is linked to their unique domain, a non canonical zinc finger, which confers to MIF the capacity to interact with other proteins. The characterization of gain- and loss-of-function lines for these genes in *Solanum lycopersicum* and *Arabidopsis thaliana* allowed us to unravel their functional homology in the termination of floral stem cell maintenance. During early floral development, *IMA* and *MIF2* gene expression is induced by the MADS-Box transcription factor AGAMOUS. Then, IMA and MIF2 proteins recruit the C₂H₂ zinc finger KNUCKLES (KNU), in a transcriptional repressor complex together with TOPLESS (TPL) and HISTONE DEACETYLASE19 (HDA19). This complex binds to the *WUSCHEL* (*WUS*) locus leading to *WUS* repression via a chromatin deacetylation mechanism. Further work allowed us to demonstrate that IMA and MIF2 play a wider role in floral development and organogenesis. Their function as adaptor protein is probably linked to their intrinsic disorder leading to structural flexibility and interaction specificity with a large range of partners.

Keywords : *Arabidopsis* ; tomato ; Mini Zinc Finger ; floral termination ; KNU ; Fruit

Laboratoire d'accueil

Cette thèse a fait l'objet d'un financement du Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Elle a été réalisée au sein de l'équipe Organogénèse du Fruit et Endoreduplication, dirigée par Christian Chevalier, et faisant partie de l'UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie de l'INRA Bordeaux-Aquitaine.

Adresse : UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie - INRA Bordeaux-Aquitaine Bât. IBVM
71, av. Edouard Bourlaux - CS 20032 - 33882 Villenave d'Ornon Cedex – France

Sommaire

Abréviations	17
Protéines	17
Unités de mesure	19
Autres	20
Figures et tableaux	23
Présentation du Manuscrit	29
Introduction	31
Le méristème apical caulinaire : une structure organisée et finement régulée	33
Structure et fonctions du méristème apical caulinaire.....	33
Régulation génétique de l'indétermination méristématique	35
La boucle de régulation <i>WUS-CLV</i> : homéostasie des cellules souches	37
Autres intervenants de la régulation de <i>WUS</i>	39
Initiation et maintien du MAC : implication des <i>KNOX</i>	41
Régulation hormonale du maintien de l'indétermination méristématique	43
Rôle des cytokinines.....	43
Rôle des gibbérellines	45
Rôle des auxines.....	45
Conclusion : le MAC, une structure dynamique et résiliente	49
La mise en place de la fleur : de l'initiation à la terminaison florale	49
L'initiation florale : passage du méristème végétatif au méristème inflorescentiel	49
Les principaux intégrateurs floraux : <i>FT</i> , <i>SOC1</i> et <i>LEAFY</i>	51
Les principaux gènes d'identité du méristème floral : <i>LEAFY</i> , <i>APETALA1</i> et <i>CAULIFLOWER</i>	53
La formation et le développement du méristème floral	53
Régulation génétique du développement du méristème floral.....	53
Régulation hormonale du développement du méristème floral et des organes floraux	57
Rôle des auxines	57
Rôle des gibbérellines.....	59
Rôle des autres hormones.....	59
Conclusion	59
La fleur des angiospermes : unique et diverse	61
Le développement floral chez deux espèces modèles : <i>A. thaliana</i> et <i>S. lycopersicum</i>	63

Le développement de la fleur chez <i>A. thaliana</i> : description anatomique	63
Le développement de la fleur chez <i>S. lycopersicum</i> : description anatomique	65
Histoire de l'étude du développement floral	65
La théorie de la métamorphose.....	67
Contrôle génétique de l'identité des organes floraux.....	67
Régulation génétique de l'identité des organes floraux : le modèle ABCE.....	69
Un modèle moléculaire : le modèle quartet.....	71
Le paradoxe des gènes de la fonction A	73
La régulation génétique de la mise en place des frontières	77
Le développement floral et la phylogénie : le modèle ABC revisité	81
La fonction A chez les autres espèces.....	81
La fonction B chez les autres espèces.....	85
Les fonctions C, D et E chez les autres espèces	87
Les gènes de la fonction C.....	87
Les gènes de la fonction D.....	91
Les gènes de la fonction E	91
La réversion florale.....	95
Régulation génétique de la réversion florale.....	97
La terminaison florale : régulation génétique	101
Rôles direct et indirect d'AGAMOUS dans la répression de <i>WUSCHEL</i>	101
Rôle direct : une intervention via les PcG	103
Rôle indirect : intervention de <i>KNUCKLES</i>	103
Le mécanisme de répression de <i>WUS</i> par <i>KNU</i> reste inconnu.....	107
Les autres intervenants de la terminaison florale.....	109
Régulation génétique et hormonale du développement du fruit	117
Le développement de la silique chez <i>A. thaliana</i>	119
Mise en place des axes de polarité	119
Régulation génétique du développement de la frontière valve-replum.....	121
Régulation génétique du développement des valves	123
Régulation génétique du développement du replum	123
Importance de la fécondation dans le développement du fruit	127
Contrôle du nombre de carpelle	127
Le développement du fruit chez <i>S. lycopersicum</i>	129
Régulation génétique du développement précoce du fruit.....	131
Importance de la régulation hormonale dans le développement précoce du fruit.....	135
Conclusion.....	137

La famille des Zinc finger Homeodomain (ZHD).....	137
Découverte des ZHD	137
Phylogénie des ZHD : une famille spécifique du règne végétal	139
Territoires d'expression des <i>ZHD</i>	141
Les ZHD chez la tomate.....	141
Rôles des ZHD : réponses aux stress et développement	143
Les gènes Mini zinc Finger (MIF).....	147
Fonction des MIF chez <i>A. thaliana</i>	147
Les gènes <i>MIF1</i> et <i>MIF3</i>	147
Le gène <i>IMA</i> (<i>INHIBITOR of MERISTEM ACTIVITY</i>)	153
Effets phénotypiques de la dérégulation du gène <i>IMA</i>	155
La surexpression d'une version chimérique (<i>IMA^{ch}</i>) entraîne une altération de la terminaison florale	157
<i>IMA</i> et le développement des ovules.....	159
Rôles d' <i>IMA</i> dans la régulation génétique de la terminaison florale.....	159
Présentation du travail de thèse	163
<i>Results and discussion</i>	169
<i>Part I: Characterization of IMA/MIF2 function</i>	171
Role of <i>IMA/MIF2</i> in floral stem cell maintenance termination	171
Article 1: The arrest of stem cell maintenance in floral meristem requires the regulation of <i>WUSCHEL</i> via a chromatin remodeling complex made of <i>KNU</i> , <i>TPL</i> , <i>HDA19</i> and <i>MIF2/IMA</i> proteins	173
Abstract	175
Introduction	177
Results and discussion.....	181
A conserved regulatory network regulates FM termination in both <i>A. thaliana</i> and <i>S. lycopersicum</i>	181
Isolation and characterization of the tomato <i>KNUCKLES</i> ortholog	185
AGAMOUS physically interacts with the promoter of <i>MIF2</i> and <i>IMA</i> and activates their expression during flower development.	187
The mis-expression of <i>MIF2/IMA</i> and <i>KNU/SIKNU</i> affects the expression pattern of <i>WUS</i> and <i>SIWUS</i> respectively	191
<i>MIF2</i> and <i>IMA</i> contribute to recruit chromatin repressive complex by physically interacting with <i>KNU</i> and <i>SIKNU</i> respectively.	197
<i>MIF2</i> , <i>KNU</i> and <i>TPL</i> binds <i>WUS</i> locus and its repression is linked to a deacetylation process... ..	199
Conclusion	203
Complementary results.....	207

Validation of IMA and SIKNU function and regulation using CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis.....	207
MIF2, a little protein involved in pathways.....	209
Effect of MIF2 over-expression on B function gene.....	209
IMA/MIF2 is involved in gibberelin regulation	213
Part II : ZHD and MIF regulatory network and interaction specificity	225
ZHD genes in angiosperms	225
ZHD expression pattern	225
MIF and ZHD interaction network	227
MIF2 subcellular localization, structure and interaction ability.....	235
Article 2 : The protein interaction ability of Mini zinc Finger 2 (MIF2) and its subcellular localization are controlled by the phosphorylation status within intrinsic disordered regions	235
Introduction	237
Results and discussion.....	239
MIni zinc Finger family in <i>Solanaceae</i> : phylogenic and expression analysis	239
MIF protein features	241
Subcellular localization and protein/protein interaction of Tomato MIF proteins	247
MIF homodimerization involves both the Zinc Finger domain and the N-terminus	247
The N-terminal domain of SIKNU/KNU is required for IMA/MIF2 interaction	249
The N- and C-terminal regions of tomato and <i>A. thaliana</i> MIF proteins are intrinsically disordered	251
IMA and MIF2 proteins display phosphorylatable N-termini.....	253
The phosphorylation status of IMA and MIF2 proteins affects protein-protein interaction and nuclear localization	253
Conclusion	257
Complementary results.....	261
MIF2 subcellular localization	261
MIF2 is localized in specific nuclear bodies named clastosomes.....	261
Chapitre 3	267
Conclusions et perspectives	267
IMA et MIF2, acteurs de la terminaison florale	269
Rôles des autres MIF chez la tomate ?	277
Rôle de MIF2 dans le contrôle de la taille des graines : implication dans la voie des GA ?....	281
MIF2, un intervenant dans la régulation des gènes de la fonction B ?	287
Les protéines MIF : la régulation par interactions	291

Quel sens peut-on donner à la localisation subcellulaire de la protéine MIF2 ?	295
Conclusion : <i>IMA/MIF2</i> un gène d'intérêt agronomique aux multiples facettes	297
Chapitre 4	301
Matériel et Méthodes	301
Matériel biologique	303
Matériel végétal et conditions de culture.....	303
<i>Solanum lycopersicum</i>	303
<i>Arabidopsis thaliana</i>	303
Epiderme d'oignon	305
Souches bactériennes et milieux de culture	305
Méthodes de manipulation et d'analyse des acides nucléiques	307
Extraction des acides nucléiques	307
Extraction de l'ADN génomique d' <i>Arabidopsis thaliana</i> et de tomate	307
Extraction des ADN plasmidiques de bactéries.....	307
Extraction d'ARN totaux et rétrotranscription	307
Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	309
PCR en temps réel.....	309
Immunoprécipitation de chromatine	311
Hybridation <i>in situ</i>	313
Synthèse et marquage des ribosomes	313
Préparation des tissus.....	313
Hybridation des ribosomes et révélation.....	313
Montage des coupes et observation microscopique	313
Clonage moléculaire	315
Clonage moléculaire par recombinaison selon la technologie Gateway®	315
Amplification de la séquence d'intérêt et insertion dans les vecteurs d'entrée	315
Clonage dans les vecteurs de destination.....	315
Vecteurs de destination utilisés	317
Vecteurs utilisés pour l'expression transitoire en épiderme d'oignon et pour le BiFC.....	317
Vecteurs pBS-35S-YFP-attR, pBS-35S-attR-YFP, p2CGW7, p2GWC7, pGWB660, pGWB661 .	317
Vecteurs NeYFP/pUGW2, CeYFP/pUGW2, NeYFP/pUGW0 et CeYFP/pUGW0.....	317
Vecteurs utilisés pour la transformation stable des plantes	319
Vecteurs de surexpressions	319
Construction <i>pPI::amiRNA-MIF2</i>	319
Vecteurs utilisés pour la production de protéines en bactérie	319
Clonage moléculaire par recombinaison selon la technologie GoldenGate pour le CRISPR/Cas9	321

Transformation de <i>E. coli</i> par électroporation.....	321
Production et purification de protéines recombinantes en bactérie.....	321
Expériences de pull-down	323
Analyse des protéines par électrophorèse monodimensionnelle en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).....	323
Révélation des protéines au bleu de Coomassie.....	325
Analyse par Western Blot.....	325
Méthodes de transgénèse et de sélection des plantes transgéniques	327
Transgénèse et sélection des plantes d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	327
Transgénèse et sélection des plantes de tomate	329
Transformation transitoire des épidermes d'oignon par biolistique.....	329
Observation de la localisation subcellulaire, et de l'interaction <i>in vivo</i> par BiFC en microscopie	331
Numéros d'accessions des genes étudiés.....	333
<i>Bibliographie</i>.....	335
<i>Annexes</i>	363
Communications.....	363
Communications orales	363
Présentation de posters.....	363
Participations à des congrès.....	364
Formation modules transverses	365
Module enseignement par l'enseignement.....	365
Module d'anglais scientifique	365
Module d'épistémologie et histoire des sciences.....	365
Activité complémentaire (2015-2016)	365

Abréviations

Protéines

AG	AGAMOUS
AGL	AGAMOUS-LIKE
AHK	ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE
ALC	ALCATRAZ
ALF	ABERRANT LEAF AND FLOWER
AP1/2/3	APETALA 1/2/3
ARR	ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR
AS1/2	ASYMMETRIC LEAVES 1/2
ATX1	ARABIDOPSIS HOMOLOG OF TRITHORAX1
BL	BLIND
BP	BREVIPEDICELLUS
BRM	BRAHMA
CAL	CAULIFLOWER
CDK	CYCLIN DEPENDANT KINASE
CLF	CURLY LEAF
CLV	CLAVATA
CNA	CORONA
CO	CONSTANS
COG1	COGWHEEL1
CRC	CRABS CLAW
CSN	COP9 SIGNALOSOME
CTR	CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE
CUC	CUP SHAPED COTYLEDON
CYC	CYCLIN
DEF	DEFICIENS
EMF2	EMBRYONIC FLOWER 2
ENO	EXCESSIVE NUMBER OF FLORAL ORGANS
ER	ERECTA
ERA	ENHANCE RESPONSE TO ABA1
ETT	ETTIN
FAB	FASCIATED AND BRANCHED
FAR	FARINELLI
FBP	FLORAL BINDING PROTEIN
FIE	FERTILIZATION-INDEPENDENT ENDOSPERM

FIN	FASCIATED INFLORESCENCE
FIS	FISTULATA
FLO	FLORICAULA
FT	FLOWERING LOCUS T
FUL	FRUITFULL
GCN	GENERAL CONTROL NONDEREPRESSIBLE
GLO	GLOBOSA
HAN	HANABA TARANU
HDA	HISTONE DEACETYLASE
HEN	HUA ENHANCER
HIPP	HEAVY METAL ASSOCIATED ISOPRENYLATED PLANT PROTEIN
IMA	INHIBITOR of MERISTEM ACTIVITY
IND	INDEHISCENT
JAG	JAGGED
KAN	KANADI
KNU	KNUCKLES
LC	LOCULE NUMBER
LFY	LEAFY
LHP1	LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN1
LIP	LIPLESS
LMI	LATE MERISTEM IDENTITY
LOG	LONELY GUY
LUG	LEUNIG
MC	MACROCALYX
MEA	MEDEA
MIF	MINI ZINC FINGER
NAC	NO APICAL MERISTEM
NUB	NUBBIN
ORG3	OBP3-RESPONSIVE GENE3
PAN	PERIANTHIA
PcG	POLYCOMB GENE
PEPC4	PHOSPHOENOL PYRUVATE CARBOXYLASE
PHB	PHABULOSA
PHV	PHAVOLUTA
PI	PISTILLATA
PIN	PIN-FORMED
PLE	PLENA
POL	POLTERGEIST
RBE	REBELOTE
REF6	RELATIVE OF EARLY FLOWERING 6
RGA	REPRESSOR OF <i>ga1-3</i>

RGL	RGA-like
RIN	RIPENING INHIBITOR
RPL	REPLUMLESS
SAP18	SIN3A ASSOCIATED PROTEIN 18
SEP	SEPALLATA
SHP	SHATTERPROOF
SIMBP	SEPALLATA MADS BOX PROTEIN
SOC1	SUPPRESSOR OF CONSTANS 1
SP	SELF PRUNING
SPT	SPATULA
SQT	SQUINT
SQUA	SQUAMOSA
STIP	STIMPY
STK	SEEDSTICK
STM	SHOOTMERISTEMLESS
STY	STYLISH
SUP	SUPERMAN
SVP	SHORT VEGETATIVE PHASE
SWN	SWINGER
SYD	SPLAYED
TAG1	TOMATO AGAMOUS 1
TAGL	TOMATO AGAMOUS LIKE
TAP3	TOMATO AP3
TFL	TERMINAL FLOWER
TM	TOMATO MADS BOX GENE
TPL	TOPLESS
TSL	TOUSLED
UFO	UNUSUAL FLORAL ORGAN
ULT1	ULTRAPETALA1
WIG	WIGGUM
WSIP	WUSCHEL INTERACTING PROTEIN
WUS	WUSCHEL
YAB	YABBY
ZHD	ZINC FINGER HOMEODOMAIN

Unités de mesure

°C	Degré Celsius
Atm	Atmosphère
AU	Arbitrary Unit
DO	Densité optique

g	Accélération
h	Heure
kDa	KiloDalton
kb	Kilobase
min	Minute
p/p, p/v, v/v	Poids/poids, poids/volume, volume/volume
pb	Paire de base
s	Seconde

Autres

6xHis	Etiquette six histidines
AA	acide aminé
ABA	acide abscissique
ADN	acide desoxyribonucléique
ADNc	acide desoxyribonucléique complémentaire
ADNg	acide desoxyribonucléique génomique
AIA	Acide Indole Acétique
amiRNA	artificial micro-RNA
AMP,ADP,ATP	Adénosine 5' mono/di/triphosphate
APS	Ammonium Persulfate
ARNm	ARN messenger
ARR	<i>Arabidopsis</i> Response Regulator
BAP	Benzyl-Amino Purine
BAR	Bio-Analytic Resource for plant Biology
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphate disodique
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
BiFC	Bimolecular Fluorescence Complementation
BSA	Bovine serum albumine
bZIP	basic leucine zipper
C, G, T, UTP	Cytosine, guanosine, thymidine, uridine 5' triphosphate
CaMV	Cauliflower mosaic virus
ChIP	Chromatin ImmunoPrecipitation
CK	Cytokinine
CO	Centre Organisateur
Col-0	Columbia-0
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CZ	Central Zone
DELLA	Asp (D), Glu (E), Leu (L), Leu(L), Ala (A)
DEPC	Diéthylpyrocarbonate
DNAse I	Désoxyribonucléase I

dNTP	Désoxynucléotide 5' triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DTT	Dithiothréitol
EAR	Ethylene-responsive element binding factor-Associated amphiphilic Repression domain
EDTA	Ethylène diamine tétraacétique
GA	Gibberellic acid
GFP	Green Fluorescent Protein
GUS	β -glucuronidase
HCA	Hydrophobic Cluster Analysis
HD	Homédomaine
HD-ZIP	leucine zipper à homéodomaine
HIS	Hybridation <i>in situ</i>
HRP	Horse radish peroxidase
IPT	Adenylate Isopentenyltransferases
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranoside
JAA	Jours après anthèse
KNOX	Knotted1-like homeobox
KO	Knocked-out
LB	Lysogeny Broth
LD	Long day
Ler	Landsberg Erecta
LRR	Leucine Rich Repeat
MAC	Méristème Apical Caulinaire
MADS	MCM1, AGAMOUS, DEFICIENS, SRF
MAR	Méristème Apical Caulinaire
MF / FM	Méristème floral / Floral meristem
MI / IM	Méristème inflorescentiel / Inflorescence meristem
miR	MicroRNA
mQ	MilliQ
MS	Murashige and Skoog medium
NBT	Nitroblue tetrazolium
ORF	Open reading frame
PBS	Phosphate buffer saline
PcG	Polycomb Gene
PCR	Polymerase Chain Reaction
PRC2	Polycomb Repressive Complex 2
PVDF	Polyfluorure de vinylidène
PZ	Peripheral Zone
qPCR	quantitative PCR
RBS	Ribosome binding site
RING	Really Interesting New Gene
RFP	Red Fluorescent Protein

RNAi	RNA interference
RNAseq	RNA sequencing
RPKM	Reads Per Kilobase per Million mapped reads
rpm	Rotation par minute
RT-PCR	Reverse-transcription PCR
RZ	Rib Zone
SALAD	Surveyed conserved motif Alignment diagram and the Associating Dendrogram
SAND	Sp100, AIRE-1, NucP41/75, DEAF-1
SD	Standard deviation
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SGN	Sol Genomics Network
SgRNA	Single guide RNA
SNP	Single nucleotide polymorphism
SSPE	Sodium saline/Phosphate/EDTA
TAE	Tris/Acide acétique/EDTA
TBS	Tris buffer saline
TBST	Tris buffer saline tween
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthyl-éthylènediamine
Tris	Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane
TSA	Trichostatin A
UV	Ultraviolet
WD40	Domaine de 40aa terminant par un Trp (W) et un Asp (D)
WVA	West Virginia
WT	Wild type
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -Dgalactoside
YFP	Yellow fluorescent protein
ZF	Zinc Finger

Figures et tableaux

Figure 1 : Organisation anatomique et fonctionnelle du méristème apical caulinaire (d'après Bowman <i>et al.</i> , 2000).....	34
Figure 2 : Modification de l'activité du méristème floral chez les mutants <i>clavata1</i> et <i>wuschel</i> (d'après Schoof <i>et al.</i> , 2000).....	36
Figure 3 : Territoires d'expression des deux principaux gènes impliqués dans le fonctionnement du méristème apical caulinaire <i>WUSCHEL</i> et <i>CLAVATA</i> . (d'après Yadav <i>et al.</i> , 2009 et Yadav <i>et al.</i> , 2013).....	38
Figure 4 : Organisation et régulation de l'indétermination du méristème apical caulinaire et de la mise en place d'un primordium (d'après Bustamante <i>et al.</i> , 2016)	40
Figure 5 : Distribution des hormones (auxines, gibbérellines et cytokinines) dans le méristème apical caulinaire au moment de la formation des primordia foliaires (d'après Shani <i>et al.</i> , 2006).....	42
Figure 6 : Les étapes clés de l'évolution du méristème végétatif vers la fleur.	50
Figure 7 : Principales voies de régulation de l'induction florale chez <i>A. thaliana</i> (d'après Ballerini et Kramer, 2011).	52
Figure 8 : Réseau génétique simplifié contrôlant la mise en place du méristème floral chez <i>A. thaliana</i> (d'après Ballerini et Kramer 2011).....	54
Figure 9 : Illustration de la diversité florale chez les Angiospermes.....	60
Figure 10 : Le développement de la fleur chez <i>Arabidopsis thaliana</i> (d'après Smyth <i>et al.</i> , 1990).....	62
Figure 11 : Principaux évènements du développement floral chez la Tomate variété WVA106 (d'après Brukhin <i>et al.</i> 2003).....	64
Figure 12 : Phénotypes des mutants et double mutants pour les différents gènes impliqués dans le développement floral (adapté d'après Laux <i>et al.</i> 1996).	66
Figure 13 : Représentation schématique des modèles ABCDE et quartet à l'origine de l'identité des organes floraux chez <i>A. thaliana</i> (d'après Weigel et Meyerowitz, 1994 et Theissen et Saedler, 2001)	70
Figure 14 : Modèle simplifié de la régulation génétique du développement de la fleur chez <i>A. thaliana</i>	72

Figure 15 : La fonction A portée par les gènes <i>AP1</i> et <i>AP2</i> chez <i>A. thaliana</i> est dépendante du micro ARN <i>Blind</i> et <i>FIS</i> chez <i>P. hybrida</i> et <i>A. majus</i> respectivement (d'après Immink <i>et al.</i> , 1999 ; Irish and Sussex, 1990 ; Keck <i>et al.</i> , 2003).	82
Figure 16 : Les gènes de la fonction B et leurs mutants respectif chez <i>A. thaliana</i> , <i>S. lycopersicum</i> et <i>P. hybrida</i> (d'après Airoidi <i>et al.</i> , 2012 ; Rijpkema <i>et al.</i> , 2006 ; De Martino <i>et al.</i> , 2006 ; Geuten et Irish, 2010).....	84
Figure 17 : Les gènes de la fonction C et D et leurs mutants respectifs chez <i>Arabidopsis</i> , <i>P. hybrida</i> , <i>S. lycopersicum</i> et <i>A. majus</i> (d'après Causier <i>et al.</i> , 2005 ; Heijmans <i>et al.</i> , 2012 ; Gimenez <i>et al.</i> , 2016).	86
Figure 18 : Les gènes de la fonction E et leurs mutants respectifs chez <i>A. thaliana</i> , <i>P. hybrida</i> et la <i>S. lycopersicum</i> (d'après Angenent <i>et al.</i> , 2003 ; Angenent <i>et al.</i> , 1994 ; Ampomah-Dwamena, 2002 ; Pnueli, 1994 ; Vandenbussche <i>et al.</i> , 2003 ; Liu <i>et al.</i> , 2013).	90
Figure 19 : La réversion florale chez <i>A. thaliana</i> , <i>S. lycopersicum</i> , <i>P. hybrida</i> et <i>Impatiens balsamina</i> (d'après Tooke <i>et al.</i> , 2005 ; Parcy <i>et al.</i> , 2002 ; Ampomah-Dwamena 2002 ; Nakano <i>et al.</i> , 2012 ; Pnueli <i>et al.</i> , 1998).	96
Figure 20 : Réseau génétique simplifié, territoires d'expression et phénotypes des mutants des principaux intervenants au cours de la terminaison du méristème floral chez <i>A. thaliana</i> (d'après Ito <i>et al.</i> , 2015 ; Landau <i>et al.</i> , 2015 ; Payne <i>et al.</i> , 2004).	100
Figure 21 : Organisation temporelle de la régulation épigénétique de l'expression des trois gènes principaux, <i>AG</i> , <i>KNU</i> et <i>WUS</i> , impliqués dans la terminaison du méristème floral (d'après Sun <i>et al.</i> , 2009 ; Ito <i>et al.</i> , 2015).	102
Figure 22 : Schéma récapitulatif de l'ensemble des intervenants connus de la terminaison du méristème floral et des phénotypes floraux liés à leurs dérégulations (d'après Ito <i>et al.</i> , 2015).....	110
Figure 23 : Organisation du gynécée chez <i>A. thaliana</i> (d'après Seymour <i>et al.</i> , 2013) ...	118
Figure 24 : Réseau génétique impliqué dans le développement de la région valve-replum de la silique d' <i>A. thaliana</i>	120
Figure 25 : Organisation anatomique du fruit de tomate au stade vert mature et détail de la structure du péricarpe.....	128
Figure 26 : Régulation génétique des différents stades de développement du fruit de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiformae</i>)	132

Figure 27 : Tableau d'interactions en double hybride entre les différentes protéines ZHD et les protéines MIF (d'après Hu et Ma 2006 et Hong <i>et al.</i> 2011).....	136
Figure 28 : Arbre phylogénétique, structure protéique et territoires d'expression des différents gènes <i>ZHD</i> d' <i>A. thaliana</i> (d'après Hu <i>et al.</i> , 2008)	138
Figure 29 : Evolution de l'expression des gènes <i>ZHD</i> au cours de la transition florale chez <i>A. thaliana</i>	140
Figure 30 : Profils d'expression des gènes <i>MIF</i> chez <i>A. thaliana</i> (d'après Hu et Ma, 2006).	146
Figure 31 : Profils d'expression des gènes <i>MIF1</i> , <i>MIF2</i> et <i>MIF3</i> , <i>KNU</i> , et <i>WUS</i> au cours de la transition florale chez <i>A. thaliana</i>	146
Figure 32 : Phénotypes végétatifs et floraux des lignées <i>35S::MIF1</i> (d'après Hu et Ma 2006).	148
Figure 33 : Phénotype végétatifs et floraux de plantes sur-exprimant <i>MIF2</i> et <i>MIF3</i> (d'après Hu et Ma, 2011).....	150
Figure 34 : Modèle schématique de la répression de <i>ZHD5</i> par <i>MIF1</i> : un système de type peptide interférent (d'après Hong <i>et al.</i> , 2011).....	152
Figure 35 : Phénotype végétatif, floral et au niveau du fruit des plantes <i>35S::IMA</i> (d'après Sicard, 2008).....	154
Figure 36 : Phénotype des fruits de plantes sauvages et <i>35S::IMA^{ch}</i> (d'après Sicard, 2008)	156
Figure 37 : Développement des ovules dans les lignées sauvages et <i>35S::IMA^{ch}</i> (d'après Sicard, 2008).....	158
Figure 38 : Profils d'expression des gènes <i>IMA</i> et <i>SIMIF1</i> chez la Tomate (d'après Sicard <i>et al.</i> , 2008).....	160
Figure 39 : Territoires d'expression des gènes <i>SIWUS</i> , <i>TAG1</i> et <i>TAG11</i> chez les plantes sauvages, perte-de-fonction <i>35S::IMA-RNAi</i> et gain-de-fonction <i>35S::IMA</i> par hybridation <i>in situ</i> (d'après Sicard <i>et al.</i> , 2008).....	162
Figure 40 : <i>MIF2</i> is the only flower-specific <i>MIF</i> gene in <i>A. thaliana</i>	180
Figure 41 : <i>MIF2</i> loss-of-function using an amiRNA under the floral specific promoter <i>PISTILLATA</i> leads to multicarpellar flower.	182

Figure 42: The chimeric IMA protein (IMA^{ch}) only contains a part of IMA zinc finger but is still able to interact with IMA native protein 182

Figure 43: *MIF2* and *IMA* loss-of-function plants develop multicarpellar fruit in *A. thaliana* and tomato respectively. 184

Figure 44: *SIKNUCKLES* phylogenetic and expression analyses 186

Figure 45: Vegetative, floral and fruit phenotypes of *SIKNU* gain- and loss-of-function lines. 188

Figure 46: *MIF2* and *IMA* expression is directly regulated by AG and TAG1 respectively 190

Figure 47: *MIF2* and *IMA* gene expression is regulated by AG and TAG1 respectively 192

Figure 48: *MIF2* and *IMA* repress *WUS* and *SIWUS* respectively during FM termination 193

Figure 49: The *SIKNU* gene expression is promoted by TAG1 to repress *SIWUS* gene expression in floral bud..... 194

Figure 50: Subcellular localization of the different proteins studied 196

Figure 51: *MIF2* and *IMA* interacts physically with *KNU* and *SIKNU* respectively..... 198

Figure 52: *In cellulo* interactions of *MIF2* and *IMA* with *KNU* and *SIKNU* are conserved between the two species and does not involve the EAR domain..... 200

Figure 53: Transcriptional repression of *WUS* gene involves a ternary *MIF2-KNU-TPL* complex in connection with a deacetylation process..... 202

Figure 54: *TPL*, *MIF2*, *SITPL3* and *IMA* physically interact *in cellulo* with *HDA19* and *SIHDA19* respectively. 204

Figure 55: CRISPR/Cas9-engineered mutations in *IMA* promoter and *SIKNU* genes result in multicarpellar fruits..... 206

Figure 56: Floral defects of *MIF2* gain- and loss-of-function lines..... 210

Figure 57: *AP3* and *PISTILLATA* expression is altered in *MIF2* gain- and loss-of-function plants. 212

Figure 58: *MIF2* physically interacts with the C₂H₂ protein *SUP* and *SUP* interacts with *SAP18* Erreur ! Signet non défini.214

Figure 59: Venn diagram showing overlapping dysregulated genes between *35S::MIF1*, *35S::ZHD11* and *35S::ZHD1* seedlings. 214

Figure 60: Seeds size and weight are increased in *MIF2* gain- and loss-of-function lines. 217

Figure 61: Seeds mucilage area is increased in <i>MIF2</i> gain and loss-of-function lines.	218
Figure 62: Multiple <i>ZHD</i> genes silencing in <i>35S::amiRNA-ZHD</i> induces vegetative and floral alteration.	220
Figure 63: <i>ZHD</i> loss-of-function lines display reduced seed size	222
Figure 64: Phylogenetic relationship and expression analysis of <i>ZHD</i>	226
Figure 65: Species relationships and expression analysis of <i>ZHD</i>	228
Figure 66: <i>In cellulo</i> localizations and interactions between <i>ZHD</i> and <i>MIF</i> proteins.	230
Figure 67: Analysis of the <i>ZHD</i> regulatory network in <i>A. thaliana</i>	232
Figure 68: Neighbor-joining tree and expression level analysis between <i>MIF</i> sequences from <i>Brassicaceae</i> and <i>Solanaceae</i> species.	240
Figure 69: <i>SIMIF7</i> (Solyc03g061620) and <i>SIMIF6</i> (Solyc02g067330) are flower- and fruit-specific genes respectively.	242
Figure 70: Distribution of domains and motifs in <i>MIF</i> protein sequences	244
Figure 71: Analysis of <i>A. thaliana</i> and Tomato <i>MIF</i> proteins.	245
Figure 72: Prediction of secondary structure of <i>MIF2</i> protein using HCA analysis	245
Figure 73: Subcellular localization and protein/protein interactions between Tomato <i>MIF</i> proteins and <i>SIKNU</i>	246
Figure 74: Characterization of the domain involved in <i>IMA/MIF2</i> homodimerization. ...	248
Figure 75: Characterization of the domain involved in the interaction between <i>IMA/MIF2</i> and <i>KNU/SIKNU</i>	250
Figure 76: The N- and C-terminal region of all <i>A. thaliana</i> and tomato <i>MIF</i> protein is disordered.	252
Figure 77: Phosphorylation of <i>IMA/MIF2</i> protein is necessary to the nuclear localization and interaction with <i>SIKNU/AtKNU</i> protein.	254
Figure 78: <i>MIF2</i> is localized in clastosomes and their shape is altered by MG132 or hormonal treatments.	262
Figure 79: Subcellular localization of <i>MIF2</i> -RFPtag and YFP-NLS in onion epidermal cell.	264
Figure 80 : Liste des constructions plasmidiques obtenue par la technologie Gateway®	318
Figure 81 : Principe du clonage via la technologie Modular Cloning (Moclo) d'après Engler <i>et al.</i> , 2014.	320

Figure 82 : Construction des vecteurs de transformation pour le CRISPR/Cas9 via la technologie MoClo	322
Table 1 : List of common deregulated genes between <i>35S::MIF1</i> , <i>35S::ZHD11</i> and <i>35S::ZHD1</i> plantlets.....	215
Table 2 : Summary of number and reported publication about the <i>ZHD</i> and <i>MIF</i> genes of each species	220
Tableau 3 : Liste des vecteurs utilisés au cours de cette étude.....	300
Tableau 4 : Liste des antibiotiques utilisés pour la sélection des plantes et des bactéries utilisés au cours de cette étude	300
Tableau 5 : Liste des amorces utilisées pour la PCR en temps réel.	304
Tableau 6 : Liste des amorces utilisées pour l'hybridation <i>in situ</i>	308
Tableau 7 : Liste des amorces utilisées pour les clonages (première partie).	310
Tableau 8 : Liste des amorces utilisées pour les clonages (deuxième partie).	312
Tableau 9 : Liste des amorces utilisées pour les constructions permettant la mutagenèse par la technique CRISPR/Cas9 et pour le séquençage des plantes mutées.....	312

Présentation du Manuscrit

Ce manuscrit de thèse est composé de quatre chapitres proposant respectivement une analyse bibliographique, l'apport de résultats nouveaux et leur discussion, leur mise en perspective et enfin le matériel et les méthodes utilisés lors de la thèse.

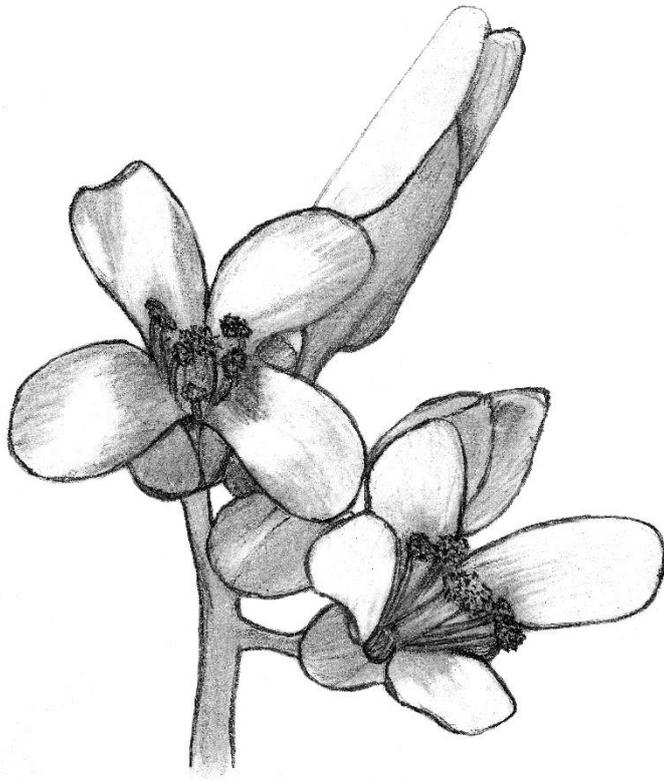
Ainsi, le premier chapitre constitue un état de l'art des travaux liés au sujet de recherche s'appuyant sur l'analyse la plus exhaustive possible de la bibliographie disponible au moment de sa rédaction. Il aborde en premier lieu la mise en place des structures contenant les cellules souches végétales que sont les méristèmes et leur devenir lors du développement floral. L'organisation et la régulation du développement floral et du fruit sont ensuite décrits, aboutissant à la mise en évidence de l'intervention dans ces processus d'une nouvelle famille de gènes codant les protéines Zinc finger HomeoDomain (ZHD).

Le second chapitre est consacré à l'analyse et à la discussion de l'ensemble des résultats obtenus lors de cette thèse de doctorat. Il est formé de deux parties comprenant chacun un manuscrit d'article, auxquels s'ajoutent des résultats complémentaires constituant des ouvertures pour de futurs travaux. La première partie est constituée d'un article scientifique en cours de publication abordant la caractérisation de la fonction des gènes *IMA* et *MIF2* dans le processus de terminaison florale chez la Tomate et *A. thaliana* respectivement, ainsi que de résultats complémentaires élargissant la fonction de ces gènes dans le développement floral. La seconde partie se compose d'un manuscrit préliminaire abordant la relation entre la structure protéique des MIF et leur capacité d'interaction physique, ainsi qu'une analyse globale des territoires d'expression et des relations qu'entretiennent les ZHD avec leurs partenaires connus.

Le troisième chapitre de ce manuscrit constitue une discussion générale de l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse, leur mise en perspective ainsi que des propositions de recherches futures nécessaires à la confirmation des résultats acquis et à la poursuite de ces travaux.

Le quatrième et dernier chapitre rassemble les protocoles utilisés pour la réalisation des expérimentations citées dans cette thèse.

Chapitre 1



Introduction

Le méristème apical caulinaire : une structure organisée et finement régulée

Chez les végétaux, l'embryon correspond à une forme juvénile issue d'une cellule unique provenant de la fécondation : le zygote. Ainsi, à la différence des animaux, l'embryon végétal n'est pas une version miniature de l'organisme adulte possédant la majorité des organes et tissus sous forme simplifiée. En effet, chez les plantes, la morphogenèse va se poursuivre tout au long de la vie de la plante. Les nombreuses divisions et la différenciation cellulaires qui suivent la fécondation permettent l'établissement d'une organisation précise impliquant notamment la polarisation apico-basale de l'embryon. Cette polarisation est associée à la mise en place de massifs de cellules indifférenciées à chacune des extrémités de l'embryon, les méristèmes apicaux caulinaire (MAC) et racinaire (MAR). Ces structures constituent le pool de cellules souches nécessaire à la croissance et au développement de l'ensemble des parties souterraines et aériennes qui forment la plante.

La croissance de la partie aérienne des plantes vasculaires est un processus modulaire et continu. Elle est assurée par la production répétée d'unités de croissance appelées phytomères constitués de quatre éléments (entre-nœud, feuille, bourgeon et nœud) dont le développement est dû au maintien d'un îlot cellulaire particulier situé à l'apex de la plante, le méristème apical caulinaire.

Structure et fonctions du méristème apical caulinaire

Le méristème apical caulinaire permet le développement végétatif de la partie aérienne de la plante par la production en continu de cellules indifférenciées assurant ainsi la possibilité d'une croissance indéterminée. Plusieurs critères concernant les cellules composant le MAC, à savoir cytoplasme dense, caractère indifférencié, taux de division important, capacité à régénérer un nouveau méristème en cas de dommage et possibilité de donner naissance à de nombreux types cellulaires, ont abouti à leur dénomination de cellules souches par comparaison avec les cellules souches animales (**Sussex *et al.*, 1952 et Potten and Loeffler, 1990**). L'étude anatomique et fonctionnelle du MAC a permis de définir deux plans d'organisation (**figure 1**).

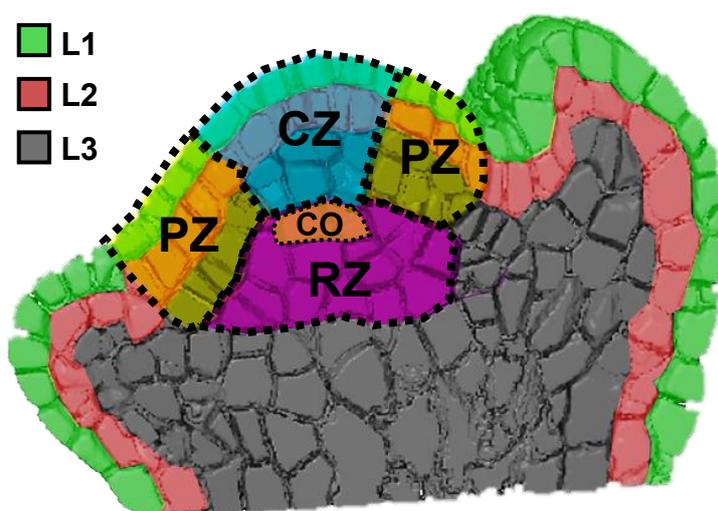


Figure 1 : Organisation anatomique et fonctionnelle du méristème apical caulinaire (d'après Bowman *et al.*, 2000).

Au niveau anatomique, le MAC est formé de trois couches cellulaires L1, L2 et L3 issues de population de cellules clonales et à l'origine du tissu épidermique, des tissus profonds et des tissus conducteurs respectivement.

Au niveau fonctionnel, il s'organise en trois zones :

- (i) La zone centrale (**CZ**) contenant les cellules souches maintenues indéterminées grâce au centre organisateur (**CO**).
- (ii) Les zones périphériques (**PZ**) où les cellules prolifèrent et se différencient durant la formation des primordia d'organes.
- (iii) La zone médullaire (Rib Zone, **RZ**) impliquée dans la formation des tissus internes au niveau de la tige.

Chez la majorité des dicotylédones, le MAC est formé par trois couches cellulaires (L1, L2 et L3) formées de populations clonales à l'origine des différents tissus qui composent la plante (**Hanstein, 1868 et Schmidt, 1924**). Les cellules de la couche L1, subissent uniquement des divisions anticlinales (perpendiculaires à l'axe de croissance) et sont à l'origine de la formation des tissus épidermiques tandis que les assises L2 et L3 assurent la mise en place des tissus profonds et vasculaires respectivement, grâce à des divisions à l'orientation plus variable (**figure 1**), (**Vaughan, 1955 et Medford et al., 1992**). En plus de cette structuration anatomique en assises, le méristème peut être découpé en trois zones qui sont définies par des signaux en provenance du centre organisateur (CO), un îlot cellulaire au sein de la zone centrale, et jouent des fonctions précises dans le développement (**Buvat, 1952 et Steeves et Sussex, 1989**). Le fonctionnement du méristème repose sur la régulation fine de la vitesse de division des cellules de ces différentes zones (**figure 1**). La zone centrale (CZ) contient les cellules souches maintenues à l'état de cellules indifférenciées grâce au contrôle assuré par le CO. En se divisant, elles alimentent les autres zones. Les divisions anticlinales des cellules de la CZ permettent l'alimentation des zones périphériques (PZ) ou elles prolifèrent et se différencient durant la formation des primordia d'organes. Les divisions péricleinales assurent l'alimentation de la zone médullaire (Rib Zone, RZ) impliquée dans la formation des tissus internes de la tige (**Carles et Fletcher, 2003 et Soyars et al., 2016**).

Cette organisation est maintenue par une signalisation cellule-à-cellule complexe contrôlant le taux de division et la différenciation des cellules issues des différentes zones. L'étude du réseau de régulation permettant le fonctionnement du MAC a fait l'objet de très nombreuses études et ce, depuis plusieurs décennies.

Régulation génétique de l'indétermination méristématique

L'étude de mutants chez l'espèce modèle *A. thaliana* affectés dans le développement de la partie aérienne a montré l'importance de certains gènes dans le fonctionnement du méristème et a permis d'établir un modèle de la régulation génétique de l'indétermination méristématique, très conservée chez les plantes (pour revue voir **Barton, 2010**).

L'isolement d'un mutant présentant une absence de formation du dôme méristématique durant l'embryogenèse et un développement aberrant de la plante à partir des méristèmes axillaires a permis d'identifier le gène majeur impliqué dans la mise en place et le maintien du

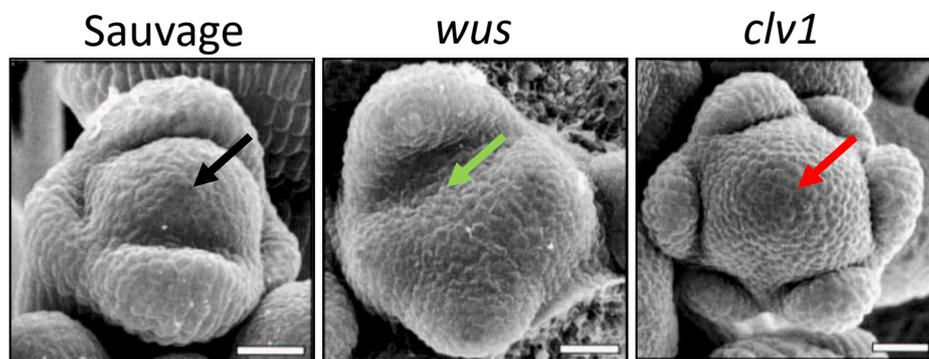


Figure 2 : Modification de l'activité du méristème floral chez les mutants *clavata1* et *wuschel* (d'après Schoof *et al.* 2000).

Au stade 3 du développement floral chez les plantes sauvages, le méristème floral est formé d'une structure convexe (flèche noire) entourée des quatre primordia de sépales. Chez le mutant *wus* l'apex est complètement plat (flèche verte) et inversement chez le mutant *clv1* il est anormalement bombé (flèche rouge).

Echelle : 10µm

méristème végétatif (**figure 2**). Le gène correspondant a été cloné et nommé *WUSCHEL* (*WUS*) (**Laux et al., 1996**) en raison de l'apparence «ébouffée» de la plante adulte. *WUS* code un facteur de transcription à homéodomaine permettant le maintien de l'indétermination méristématique et la production de cellules méristématiques. Son expression est précoce (dès le stade embryonnaire) et restreinte au CO (**Mayer et al., 1998**).

La boucle de régulation *WUS-CLV* : homéostasie des cellules souches

Le mécanisme de restriction de l'expression de *WUS* au niveau du CO a été élucidé par l'étude de mutants présentant une hypertrophie du méristème (**figure 2**). Chez ces mutants, l'expression de *WUS* est élargie indiquant que l'expression du gène responsable de la restriction de l'expression de *WUS* est réduite voire annulée (**Schoof et al., 2000**). Cela se traduit au niveau phénotypique par une augmentation du volume du dôme méristématique liée à l'augmentation de la quantité de cellules couches en prolifération (**figure 2**). Par test d'allélisme, trois gènes nommés *CLAVATA* (*CLV*) en raison de leurs siliques en forme de club de golf, ont été mis en évidence. *CLV3* agit de manière non cellule-autonome (**Clark et al., 1995**). En effet, le peptide codé par *CLV3* (*CLV3p*) est sécrété par les cellules de la CZ, diffuse autour du CO et est perçu par des récepteurs kinases dont la signalisation sous-jacente aboutie à l'inhibition de l'expression de *WUS* (**figure 2**) (**Ogawa et al., 2008**). *WUS* est lui-même responsable de sa restriction, exprimé dans le CO, il diffuse à travers les plasmodesmes vers les cellules de la CZ où il active l'expression des gènes *CLV* (**figure 3**) (**Brand et al., 2000 ; Lenhard et Laux, 2003 et Yadav et al., 2011**). L'expression de *WUS* permet donc d'alimenter le méristème en cellules indifférenciées tandis que sa restriction au CO par les gènes *CLV* va permettre la mise en place des différentes zones.

De récents travaux ont aujourd'hui apporté des éléments confirmant le fait depuis longtemps énoncé que la boucle de rétrocontrôle faisant intervenir *WUS* et *pCLV3* forme une structure de réaction-diffusion aussi appelée « structure de Turing » (**Fujita et al., 2011**). Cette structure, définie par Alan Turing au cours de travaux sur la morphogenèse (**Turing, 1952**), consiste en la variation dans l'espace de deux molécules dénommées « morphogènes », l'une agissant comme activateur, ici *WUS*, promouvant la prolifération des cellules souches méristématique, s'auto-amplifiant, *WUS* active sa propre expression dans les cellules avoisinantes par diffusion au travers des plasmodesmes et active l'expression du second

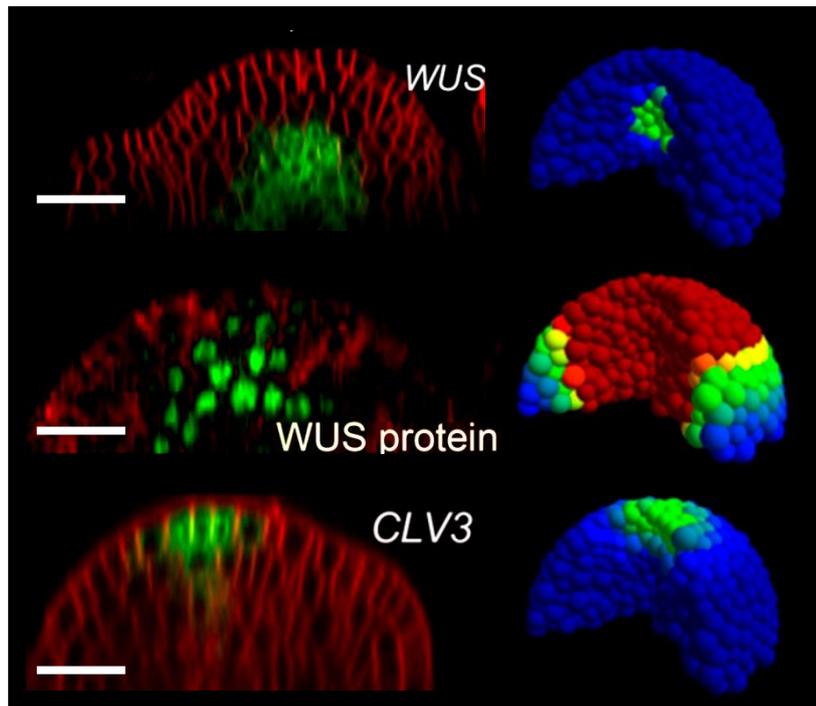


Figure 3 : Territoires d'expression des deux principaux gènes impliqués dans le fonctionnement du méristème apical caulinaire *WUSCHEL* et *CLAVATA*. (d'après Yadav *et al.*, 2009 et Yadav *et al.*, 2013).

La première colonne correspond à une vue longitudinale au microscope confocal révélant la distribution des ARN de *WUS* et *CLV3* (A et C respectivement) ou de la protéine *WUS* (B).

La deuxième colonne correspond à la modélisation des territoires d'expression ou de localisation de la protéine dans le dôme méristématique. La quantité est codée en gradient de couleur du bleu vers le rouge.

Echelle : 25 μ m

morphogène : CLV3p qui agit comme un inhibiteur du premier et diffuse plus vite et plus loin que le premier, notamment grâce à sa faible taille (le monomère CLV3p ne faisant que 6kDa). Ainsi CLV3p est responsable de l'inhibition de l'expression de *WUS* (**figure 3**).

Cette voie de régulation initialement découverte chez *A. thaliana* s'est révélée conservée chez de nombreuses espèces telles que le maïs, le riz ou encore la tomate (**Reinhardt et al., 2003**). *CLV3p* est un glycopeptide de 13 acides aminés contenant trois résidus L-arabinose, dont l'ajout est dépendant de l'action d'enzymes appelées arabinosyltransferases, lui assurant une haute affinité avec ses récepteurs (**Shinohara et al., 2013**). Un travail récent effectué chez la tomate indique que la mutation du gène *FASCIATED INFLORESCENCE (FIN)* codant une hydroxyproline O-arabinosyltransferase donne lieu à un élargissement des méristèmes à l'origine de fleurs fasciées possédant un nombre d'organes floraux augmenté, entraînant la formation de fruits possédant un nombre de loges plus important (**Xu et al., 2015**). La démonstration de la nécessité de l'arabinosylation de CLV3p pour son activité a été notamment démontrée par le fait qu'il est possible de restaurer un phénotype sauvage par ajout de CLV3p arabinosylé chez le mutant *fin*. De surcroît, la mutation du gène *FASCIATED AND BRANCHED (FAB)*, homologue de *CLV1* chez la tomate, entraîne elle aussi des phénotypes fasciés comme précédemment décrits (**Xu et al., 2015**). De façon intéressante, *A. thaliana* et *S. lycopersicum* ne semblent pas posséder la même sensibilité à la réduction d'expression de *CLV3*. En effet, le mutant de tomate *fasciated (fas)* muté au niveau du promoteur de l'homologue de *CLV3*, ne possède qu'une faible réduction du niveau d'expression de *CLV3* mais présente de sévères phénotypes tandis que pour un même niveau de réduction d'expression, les lignées perte-de-fonction *clv3* d'*A. thaliana* ne présentent aucun phénotype. Cette différence, bien que partiellement spéculative, est un élément d'intérêt dans notre étude des mécanismes communs ou au contraire, spécifiques, aux deux espèces.

Bien que la boucle *WUS-CLV* soit un élément majeur du maintien de l'intégrité du MAC, d'autres intervenants jouent un rôle décisif dans sa formation et son équilibre dynamique.

Autres intervenants de la régulation de *WUS*

Plusieurs autres gènes sont impliqués dans la restriction de l'expression de *WUS* au sein du CO par des voies parfois parallèles ou connectées avec la voie CLAVATA. Par exemple, le gène *HANABA TARANU (HAN)*, codant un facteur de transcription de la famille GATA intervient dans

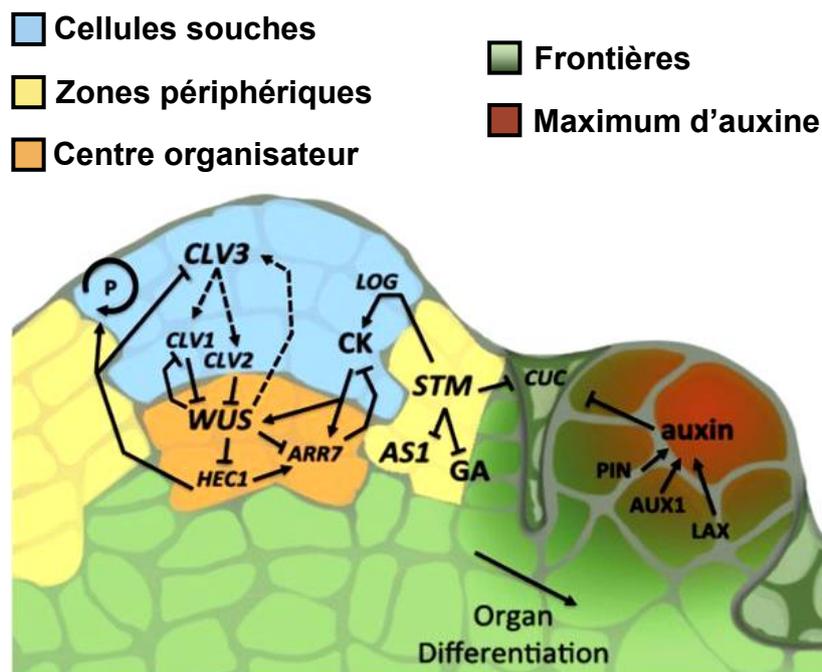


Figure 4 : Organisation et régulation de l'indétermination du méristème apical caulinaire et de la mise en place d'un primordium (d'après Bustamante *et al.*, 2016)

Le pool de cellules indéterminées est maintenu par la boucle de régulation *WUS/CLV3*.

Les CK assurent la restriction du domaine d'expression de *WUS* dans le CO. *STM* active la synthèse des CK au travers du gène *LOG*. La sensibilité au CK des cellules du CO est permise par la repression d'*ARR7*.

HEC1 est une cible directe de *WUS* dans le CO impliquée dans la promotion de la prolifération cellulaire (P).

STM et les autres *KNOX* interviennent aussi dans le maintien de l'indétermination par repression d'*AS1* et de la synthèse des GA.

Les gènes *CUC* sont négativement régulés par *STM* et par les auxines produites dans le primordium en formation restreignant leur expression à la frontière.

la restriction de *WUS* par une voie parallèle à celle de *CLV* (Zhao *et al.*, 2004). En effet, le mutant *han* présente un MAC plat et plus petit que les plantes sauvages et le double mutant *clv han* présente un MAC encore plus gros et fascié que le simple mutant *clv* (Zhao *et al.*, 2004). De façon équivalente, les gènes *PHABULOSA* (*PHB*), *PHAVOLUTA* (*PHV*) et *CORONA* (*CNA*) appartenant à la famille des leucine zipper à homéodomaine de classe 3 (HD-ZIP III), interviennent dans la restriction de la taille du MAC. En effet, la mutation simultanée de ces trois gènes entraîne un élargissement du MAC résultant de l'élargissement de la zone d'expression de *WUS* (Prigge *et al.*, 2005 et Green *et al.*, 2005).

Le gène *ULTRAPETALA1* (*ULT1*) codant un facteur de transcription à domaine Sp100, AIRE-1, NucP41/75, DEAF-1 (SAND) (Fletcher, 2001 et Carles *et al.*, 2005) intervient lui aussi dans la régulation du gène *WUS* par une voie indépendante de la voie *CLV* puisque la mutation d'*ULT1* entraîne un élargissement du MAC de manière synergique à la mutation de *CLV* (Fletcher, 2001).

Initiation et maintien du MAC : implication des KNOX

Un autre mutant d'*A. thaliana* isolé en 1993 et ne présentant pas de MAC, révèle l'intervention d'un autre gène dans la régulation de l'indétermination méristématique, il s'agit du gène *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*) (Barton et Poethig, 1993). *STM* est un facteur de transcription à homéodomaine de la classe des Knotted1-like homeobox (*KNOX*), orthologue de *KNOTTED1* chez le maïs (Long *et al.*, 1996). *STM* est un régulateur positif de *WUS*, en effet, la surexpression transitoire du gène *STM* induit une augmentation du niveau d'expression de *WUS* (Brand *et al.*, 2002). De surcroît, *STM* ainsi que d'autres protéines de la famille des *KNOX* (*KNAT1/BREVIPEDICELLUS*, *KNAT2* et *KNAT6*) agissent comme répresseurs de la différenciation des cellules souches notamment par l'inhibition au centre du méristème de l'expression des gènes *ASYMMETRIC LEAVES 1* (*AS1*) et 2 (*AS2*) (Byrne *et al.*, 2000), impliqués dans l'émergence des organes latéraux (figure 5). Inversement, *AS1* et *AS2* répriment l'expression des *KNOX* dans les primordia d'organes foliaires permettant leur différenciation (Lin *et al.*, 2003).

Bien que ce réseau de régulation génétique soit déjà complexe, la dynamique et la résilience nécessaires au bon fonctionnement du MAC reposent grandement sur la régulation hormonale.

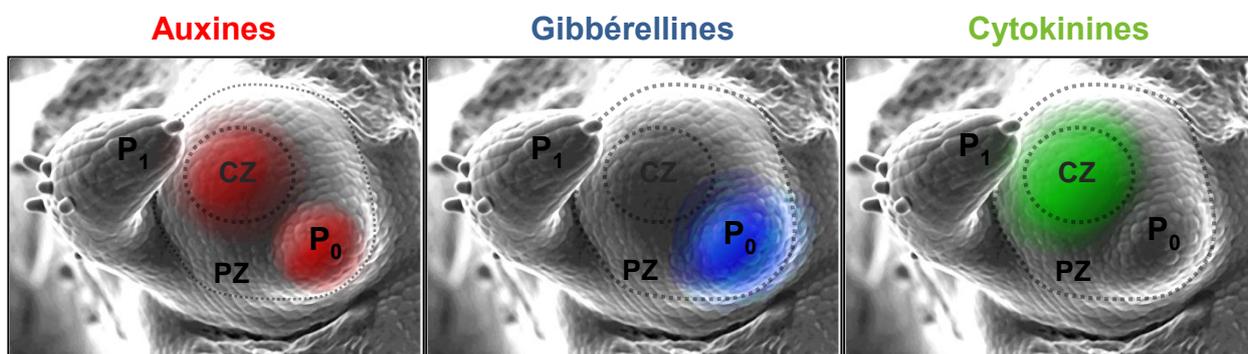


Figure 5 : Distribution des hormones (auxines, gibbérellines et cytokinines) dans le méristème apical caulinaire au moment de la formation des primordia foliaires (d'après Shani *et al.*, 2006).

Au niveau de la zone centrale (CZ) Le fort ratio CK/Aux permet de maintenir la prolifération cellulaire sans initiation de primordium. P₀ indique le territoire de la zone périphérique (PZ) où se trouvent les cellules fondatrices à l'origine du futur primordium. Elle est caractérisée par un fort niveau d'auxines et de GA permettant la différenciation cellulaire.

Régulation hormonale du maintien de l'indétermination méristématique

Rôle des cytokinines

Les cytokinines (CK), découvertes dans les années 1950 pour leur capacité à promouvoir la prolifération cellulaire, sont une classe d'hormones formées d'une base adénosine phosphorylée à laquelle sont ajoutés des groupements isoprènes par des enzymes, les adénylate isopentenyltransferases (IPT). Les CK jouent un rôle important dans le maintien du MAC. Le métabolisme et la signalisation des CK sont l'objet de nombreuses régulations. Les facteurs de transcription de la classe KNOX1 (STM, KNAT2 et BP) interviennent dans la régulation de la synthèse des CK. En effet, ils agissent notamment en activant l'expression du gène *AtIPT7*, entraînant une augmentation de la synthèse des CK (**Jasinski et al., 2005**). Les gènes de la famille de *LONELY GUY (LOG)* initialement découverts chez le riz sont aussi des acteurs importants de l'indétermination méristématique, régulant l'activation des CK (**figure 4 et 5**). En effet, plusieurs de ces gènes codent des phosphoribohydrolases convertissant les CK inactives en CK actives. En coordination avec la voie de signalisation CLV, ils interviennent dans le positionnement de l'expression de *WUS* dans le CO (**Chickarmane et al., 2012**). Concernant leur signalisation, les cytokinines sont perçues par les récepteurs HISTIDINE KINASE (AHK) puis le signal est transmis aux facteurs de transcription *Arabidopsis thaliana* Response Regulator (ARR-A et ARR-B). Les ARR-B activent la voie de signalisation des CK tandis que les ARR-A la répriment. *WUS*, en réprimant directement l'expression de plusieurs ARR-A, active la voie de signalisation des CK (**Leibfried et al., 2005**). Le rôle de *WUS* en tant que répresseur transcriptionnel dans la voie de signalisation des CK a été notamment démontré par sa capacité d'interaction avec les co-répresseurs WSIP1/TOPLESS et WSIP2 (**Kieffer et al., 2006 et Long et al., 2006**). Enfin, le facteur de transcription *STIP* cité précédemment, intervient lui aussi dans la voie de signalisation des CK pour favoriser la prolifération cellulaire au sein du MAC (**Skylar et al., 2010**).

Rôle des gibbérellines

La voie de régulation de l'indétermination méristématique implique aussi une régulation par les gibbérellines (GA). Les gibbérellines constituent une classe d'hormones découvertes en 1938 comprenant un grand nombre de diterpènes tétracycliques impliqués dans l'expansion des organes et la morphogenèse chez les plantes supérieures (**Richards et al., 2001**). Elles sont tout comme les CK, finement associées à l'expression des gènes de la famille des KNOX. A l'opposé de leur action positive sur les CK, une relation antagoniste existe entre les KNOX et les GA (**figure 4**). En effet, STM intervient en tant que régulateur positif de l'expression des gènes codants des GA 2-oxydases impliquées dans l'inactivation des GA actives (*AtGA2ox2* et *AtGA2ox4*). Il assure ainsi la nécessaire répression de l'activité des GA dans la CZ pour le maintien de l'intégrité du méristème, tandis que l'activité des GA est maintenue au niveau des PZ permettant la formation des organes latéraux (**Jasinki et al., 2005 et Sakamoto, 2001**) (**figure 5**). De surcroît, il a été montré que la surexpression de *KNAT1* entraîne une diminution du niveau d'expression d'*AtGA20ox1* codant une enzyme de la voie de biosynthèse des GA mais aussi qu'à l'inverse, le mutant *stm* présente une expression augmentée de ce même gène (**Hay et al., 2002**), confirmant la fonction des gènes *KNOX1* dans la répression de la synthèse de GA dans le MAC.

Ainsi, les CK et les GA jouent des rôles antagonistes. La formation de gradients de concentration entre ces hormones au sein du méristème permet la mise en place des frontières et la délimitation des zones d'émergences des primordia (**figure 5**). À ces deux classes d'hormones s'ajoutent une troisième, les auxines, dont l'implication dans l'émergence des organes latéraux a été finement étudiée.

Rôle des auxines

Les auxines sont majoritairement synthétisées à partir du tryptophane mais leurs voies de biosynthèse sont nombreuses. En tant que premières hormones végétales découvertes dans les années 1920-1930 et pour leurs multiples rôles dans la croissance et le développement des plantes, l'implication des auxines dans le fonctionnement du méristème et particulièrement la formation des primordia d'organes a été le sujet de très nombreuses études. L'identification en 1991 du mutant d'*A. thaliana* appelé *pin-formed 1* (*pin1*) en raison de la forme de sa tige inflorescentielle en aiguille liée à son incapacité à initier la formation de fleurs

(Okada *et al.*, 1991) a été l'un des premiers arguments permettant d'impliquer les auxines dans la régulation de la formation des organes latéraux. Le gène muté code une protéine transmembranaire impliquée dans le transport polarisé de l'auxine (pour revue voir Petrasek et Friml, 2009). Les membres de la famille *PIN* sont impliqués dans la modification de la concentration des auxines en des points particuliers du MAC, lesquels constituent les points d'émergence des primordia (figure 4 et 5). Le gène *STM* est réprimé dans les primordia d'organes foliaires en formation dès le début de l'accumulation d'auxines (Heisler *et al.*, 2005), suggérant un rôle des auxines dans l'exclusion de *STM* du primordia en formation. De plus, *KNAT1/BP* est exprimé de façon ectopique dans les feuilles du mutant *pin1* et à l'inverse, le double mutant *bp pin1* supprime partiellement la capacité de *pin1* à initier la formation de feuilles (Hay *et al.*, 2006). Ces données confirment le rôle des auxines dans l'exclusion des *KNOX1* des primordia en formation. D'autres transporteurs présents dans le MAC tels les *AUX/LAX* interviennent aussi dans la distribution spatiale des auxines. Le métabolisme de l'auxine joue aussi un rôle important dans le fonctionnement du MAC comme le montrent les différentes études effectuées sur les gènes de la famille *YUCCA* impliqués dans la biosynthèse des auxines (Cheng *et al.*, 2007). La transduction du signal auxinique implique un grand nombre de facteurs appartenant aux familles des Aux/IAA et des Auxin Response Factors (ARF). Ceux-ci sont capables de former des homo- et des hétéro-dimères se fixant aux motifs de réponse à l'auxine présents dans les séquences des gènes cibles, favorisant ou empêchant leur transcription (pour revue voir Liscum et Reed 2002). L'auxine promeut la dégradation des Aux/IAA permettant aux ARFs d'activer ou de réprimer la transcription. La mutation du gène *ARF5/MONOPTEROS* induit un phénotype similaire au mutant *pin1* et bloque la réponse du méristème à un ajout exogène d'auxine (Hardtke and Berleth, 1998) indiquant que l'initiation des organes latéraux est dépendante de la transduction du signal auxinique par ARF5.

Ainsi le métabolisme, le transport mais aussi la transduction du signal auxinique sont essentiels à l'émergence des organes latéraux par la mise en place du programme morphogénétique approprié.

Conclusion : le MAC, une structure dynamique et résiliente

Le réseau de régulation permettant le maintien de l'indétermination méristématique et l'initiation des organes latéraux est composé de nombreuses voies génétiques et hormonales interconnectées assurant la résilience du MAC nécessaire au développement continu de la plante.

Au cours du développement de la plante, lorsque celle-ci arrive à maturité sexuelle, sous l'action de différents facteurs hormonaux et environnementaux, la floraison va être induite permettant la mise en place d'un programme génétique particulier conduisant à la transformation du méristème apical caulinaire en méristème inflorescentiel. Le méristème inflorescentiel va ensuite former des méristèmes floraux au cours d'une phase appelée transition florale. Le passage du méristème végétatif au méristème floral nécessite la spécification de l'identité du méristème floral contrôlée par un programme génétique précis.

La mise en place de la fleur : de l'initiation à la terminaison florale

Le passage de la phase végétative à la phase reproductrice implique une transformation des méristèmes végétatifs en méristèmes inflorescentiels puis en méristèmes floraux. Les méristèmes, à chacune de ces étapes présentent une organisation et possèdent des propriétés spécifiques. Le méristème végétatif est une structure indéterminée produisant des feuilles et d'autres organes spécialisés tels que les méristèmes axillaires. Dans les conditions adéquates, à la floraison, il va donner naissance au méristème inflorescentiel (MI) qui peut être déterminé ou indéterminé en fonction des espèces. Le MI produit alors des feuilles, des bractées et des méristèmes floraux.

L'initiation florale: passage du méristème végétatif au méristème inflorescentiel

La transition florale traduit la transformation du méristème apical caulinaire en méristème inflorescentiel. Durant la floraison, avant que les méristèmes floraux ne se forment, le méristème inflorescentiel produit quelques feuilles caulines et des méristèmes axillaires

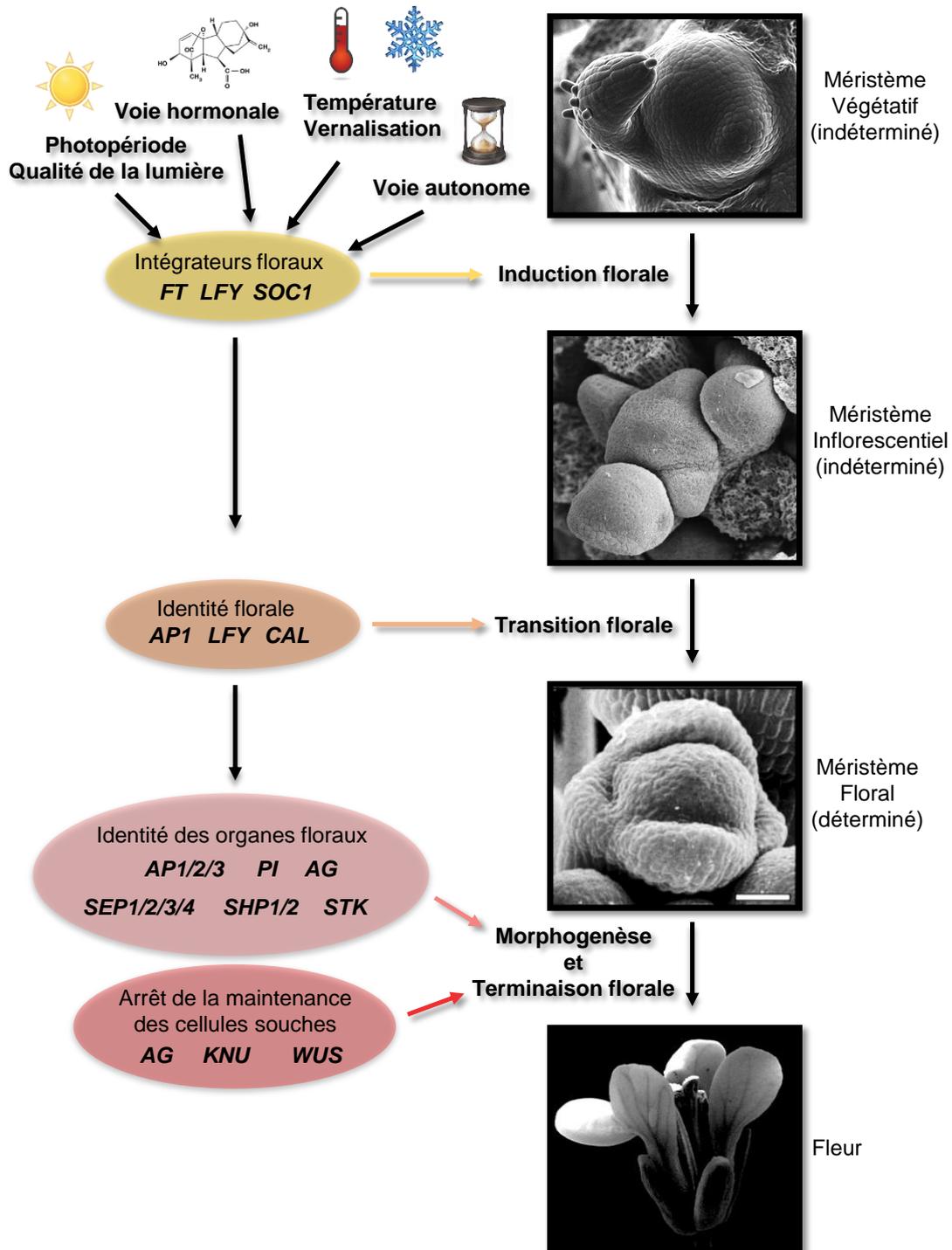


Figure 6 : Les étapes clés de l'évolution du méristème végétatif vers la fleur.

Trois étapes majeures vont permettre la mise en place de la fleur : l'induction florale, la transition florale et la morphogenèse et la terminaison florale.

associés. Le méristème floral est typiquement soutenu par des bractées bien que ces feuilles modifiées aient disparu chez certaines familles telles les brassicacées et les poacées (**Causier et Davies, 2014**). Elles peuvent être observées chez certains mutants tels que *puchi bop1 bop2* (**Karim et al., 2009**) indiquant que leur absence est issue d'une spécialisation du programme génétique dans les espèces concernées. L'induction florale qui précède la phase de transition florale proprement dite est activée par quatre voies dépendantes de facteurs environnementaux (photopériode et vernalisation) ou intrinsèques à la plante (voies autonome et hormonale) (**figure 6 et 7**).

Les principaux intégrateurs floraux : *FT*, *SOC1* et *LEAFY*

L'intégration de ces voies se fait grâce à un réseau génétique complexe impliquant trois gènes majeurs (**figure 6 et 7**) (pour revue voir **Boss et al., 2004**). Le gène *Flowering locus T* (*FT*) code une protéine associée à la membrane intégrant les signaux provenant de la voie d'induction photopériodique. Ces signaux sont captés au travers des photorécepteurs, cryptochromes et phytochromes influençant l'horloge circadienne de la plante (pour revue voir **Putterill et al., 2004**). En condition de jours longs, condition inductible de la floraison chez *A. thaliana*, l'expression circadienne du gène *CONSTANS* (*CO*) va permettre la production diurne de protéines actives qui vont activer l'expression de *FT* (pour revue voir **Andrés et Coupland, 2012**) (**figure 7**). En parallèle à l'action de *CO*, l'expression de *FT* est également contrôlée par les voies autonomes et de la vernalisation en contrôlant l'expression de *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*), un répresseur transcriptionnel de *FT* (**figure 7**). Le gène *SUPPRESSOR OF CONSTANS 1* (*SOC1*) code pour un facteur de transcription à MADS-BOX qui est, tout comme *FT*, réprimé par *FLC* (intégrant ainsi la voie autonome et de la vernalisation) et activé en conditions de jours longs (via *CO*) et par les gibbérellines (**figure 7**). Le troisième intégrateur floral est aussi un gène d'identité du méristème floral, il s'agit de *LEAFY* (*LFY*) (**Weigel, 1992**). Il est directement induit par *SOC1* (**Lee et al., 2008**) et par la voie des gibbérellines (**Blazquez et al., 1998**) (**figure 7**). Ces trois intégrateurs floraux vont activer l'expression des gènes d'identité du méristème floral qui sont essentiels au passage du méristème vers une phase reproductrice (**figure 6**).

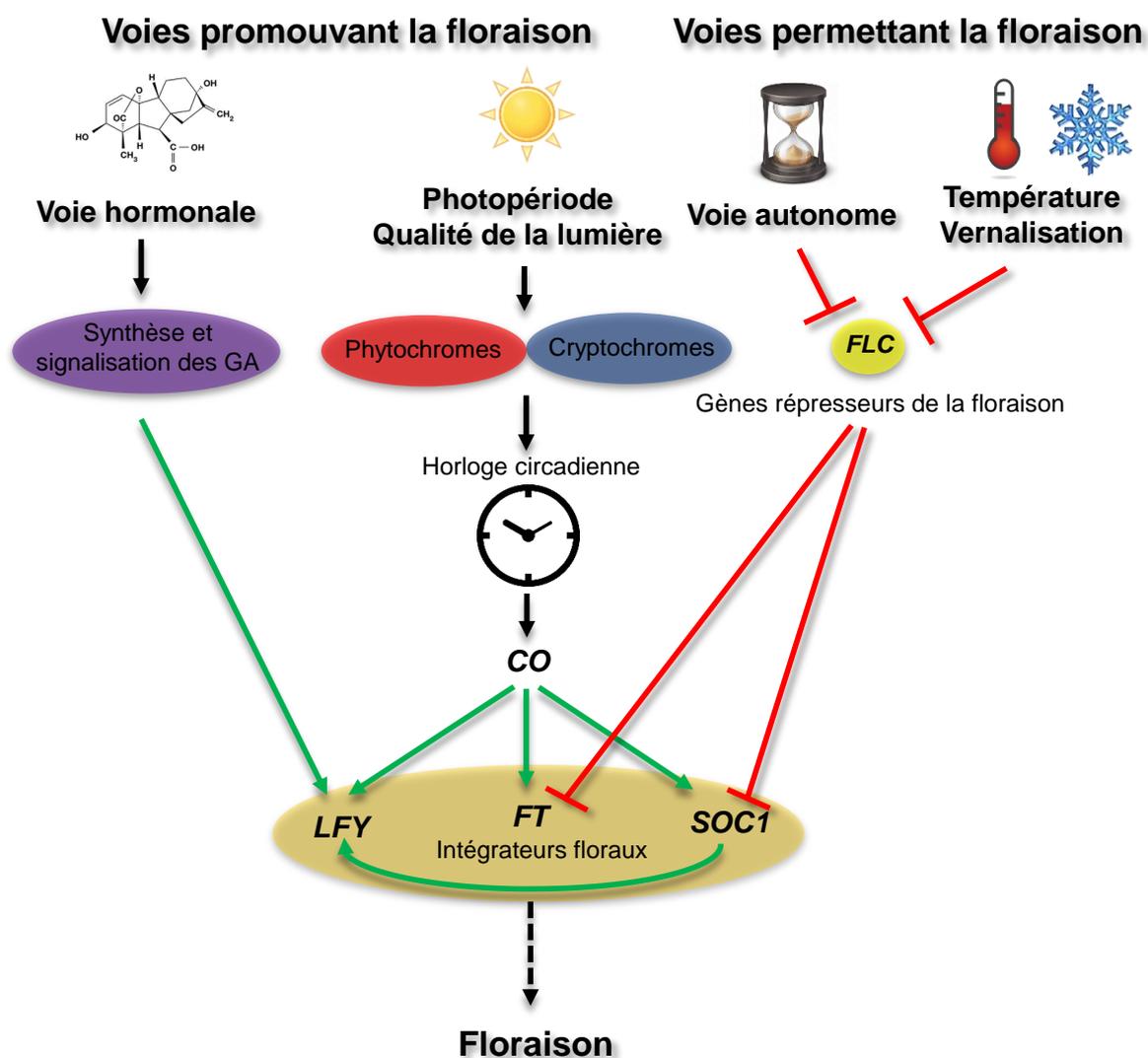


Figure 7 : Principales voies de régulation de l'induction florale chez *A. thaliana* (d'après Ballerini et Kramer, 2011). Quatre grandes voies sont nécessaires à la promotion de l'induction florale, dépendantes de facteurs environnementaux (photopériode et vernalisation) ou intrinsèques à la plante (voies autonome et hormonale). L'ensemble de ces voies, intégrées par des gènes clés (*LFY*, *FT* et *SOC1*), contrôle l'initiation de la floraison.

Les principaux gènes d'identité du méristème floral : *LEAFY*, *APETALA1* et *CAULIFLOWER*

La principale caractéristique de l'identité du méristème floral correspond à l'implication de régulations mutuelles entre les gènes qui interviennent dans son acquisition. Ces interactions rendent la compréhension et la définition du stade «méristème floral» complexe mais permettent au niveau physiologique une plasticité vis à vis des conditions environnementales et assure au méristème une transition correcte (pour revue voir **Blazquez et al., 2006**).

Parmi l'ensemble des gènes de l'identité du méristème floral, *LEAFY* (*LFY*) et *APETALA1* (*AP1*) jouent un rôle prépondérant. Ils sont impliqués non seulement dans l'identité du méristème floral mais aussi et surtout, dans le contrôle des gènes dits « d'identité florale », gouvernant ainsi la mise en place des différents organes floraux. Plusieurs autres gènes sont nécessaires au développement normal et déterminé du méristème floral, il s'agit des gènes *CAULIFLOWER* (*CAL*), *APETALA2* (*AP2*), *UNUSUAL FLORAL ORGANS* (*UFO*) et *AGAMOUS* (*AG*) qui seront également abordés dans cette introduction.

La fleur constituée des quatre types d'organes floraux (sépalés, pétales, étamines, carpelles) est le résultat de l'activité du méristème floral. Elle forme habituellement une structure déterminée. Nous verrons cependant que dans quelques cas, un retour à un stade végétatif est possible, et ce, par un mécanisme appelé réversion florale.

La formation et le développement du méristème floral

Régulation génétique du développement du méristème floral

Le méristème floral présente des similitudes avec les méristèmes axillaires de par la présence de deux domaines distincts, un domaine compétent pour la formation de feuilles et un domaine méristématique (**Long et Barton, 2000**). L'avenir de ces deux domaines dépend du stade développemental de la plante. En effet, ces domaines donnent naissance à des feuilles de rosette, à un méristème axillaire en phase végétative, et à des bractées avec des fleurs en phase reproductrice. Le devenir des primordia provenant de chacun de ces domaines peut être modifié après leur initiation, indiquant que leur devenir n'est pas déterminé lors de leur formation. Le développement du méristème floral est caractérisé par plusieurs phases

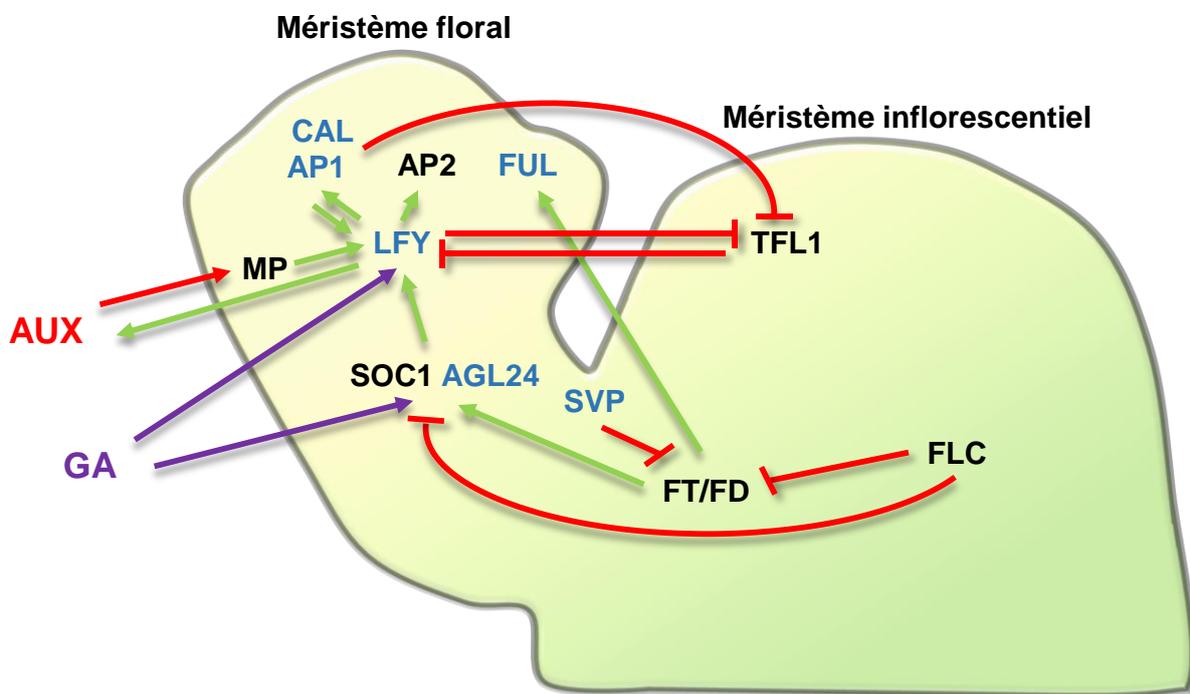


Figure 8 : Réseau génétique simplifié contrôlant la mise en place du méristème floral chez *A. thaliana* (d'après Ballerini et Kramer, 2011).

Suite à la transition florale, les gènes d'identité du méristème floral (*LFY*, *CAL*, *AP1*) vont réguler un grand nombre de gènes essentiels à la mise en place du méristème floral et *in fine* au développement de la fleur. En plus de cette régulation génétique, les hormones (auxines et gibbérellines) jouent aussi des rôles essentiels.

(Smyth *et al.*, 1990). La première correspond à la formation d'une région au sein du méristème inflorescentiel à partir de laquelle le méristème floral se forme. Une excroissance se développe ensuite et le primordium floral apparaît. Par la suite, lorsque le méristème floral est formé, les primordia floraux vont se développer pour donner naissance aux organes floraux. Les trois phases sont donc (i) la formation de l'anlagen (groupe de cellules à l'origine du primordium du méristème floral), (ii) l'initiation du méristème floral et (iii) la différenciation des organes floraux (Chandler *et al.*, 2012). C'est la découverte de mutants présentant des structures feuillées à la place des fleurs (conséquence de l'absence de mise en place du méristème floral) qui a permis de montrer que ces voies aboutissent à l'activation des gènes dits «d'identité» du méristème floral. Il s'agit notamment des gènes *LFY* et *AP1* précédemment cités. L'activation de ces gènes va permettre la mise en place du programme génétique de formation de la fleur (figure 8). Suite à cette activation, l'expression de *LFY* est renforcée par une boucle de rétrocontrôle positive via *AP1* et *CAL* empêchant la réversion du méristème floral vers un méristème indéterminé (Ferrandiz *et al.*, 2010). La perte de fonction *lfy* ou *ap1* donne lieu à l'apparition de fleurs aberrantes. Ce phénotype est encore plus fort chez *Antirrhinum* et *Petunia* pour qui les mutations respectives de *FLORICAULA* et *ABERRANT LEAF AND FLOWER*, homologues de *LFY*, entraînent une absence totale de développement de fleurs (Coen *et al.*, 1990 et Souer *et al.*, 1998). Les mêmes phénotypes sont observés chez les mutants pour les homologues de *AP1*, *SQUAMOSA* et *PETUNIA FLOWERING GENE* chez *Antirrhinum* et *Petunia*, respectivement (Huijser *et al.*, 1992 ; Immink *et al.*, 1999). L'identité du méristème floral est aussi contrôlée par d'autres gènes tels que *AP2* et les gènes *SEPALLATA* (*SEP1-4*) chez *A. thaliana* (pour revue voir Causier *et al.*, 2010). Chez *Antirrhinum*, deux homologues de ces gènes existent et agissent de manière redondante, il s'agit des gènes *LIPLESS1* et *2* (Keck *et al.*, 2003). Bien que des différences existent, la fonction des gènes *SEP* est bien conservée dans les autres espèces de dicotylédones (pour revue voir : Rijpkema *et al.*, 2010).

Les rôles de deux autres facteurs de transcription, *AGL24* et *SVP* (*SHORT VEGETATIVE PHASE*) dans le contrôle de l'identité du méristème floral ont été démontrés (pour revue voir Gregis *et al.*, 2008) (figure 8). Ainsi, dès le stade 3 du développement floral, l'expression du gène *SVP* est perdue et les gènes *SEP* sont activés. Il semble ainsi que les protéines codées par les gènes *SEP* entrent en compétition avec *AGL24* et *SVP* pour la fixation sur *AP1* et que les

dimères AP1-SEP éteignent l'expression de *SVP* et *AGL24* permettant la formation des organes floraux. L'un des gènes exprimé le plus précocement dans l'anlagen est *LEAFY*, qui, nous l'avons vu, active un grand nombre de gènes d'identité du méristème floral (*AP1*, *CAL*, *SEP1-4*, *LMI1-2*) (Weigel *et al.*, 1992) (figure 8). Cependant, la formation de l'anlagen nécessite également un réseau complexe d'interconnexions des voies de signalisations hormonales (Reinhardt *et al.*, 2003).

Régulation hormonale du développement du méristème floral et des organes floraux

Bien que le réseau de régulation génétique impliqué dans la mise en place et le développement des méristèmes floraux soit de mieux en mieux décrit, l'implication de ces différents facteurs à l'échelle des mécanismes cellulaires de division, de croissance et de différenciation reste méconnue. En tant que principales voies de transduction des signaux cellulaires, les voies hormonales sont très largement impliquées dans ces mécanismes. De manière équivalente aux travaux effectués sur le MAC, de très nombreux travaux ont permis de montrer l'implication des cytokinines, des gibbérellines, de l'ABA et des auxines dans l'initiation du méristème floral, des organes floraux et dans l'organogenèse.

Rôle des auxines

Comme pour le MAC, le rôle des auxines sur l'initiation latérale des MF et des organes floraux a été démontré par de multiples études. En effet, chez *A. thaliana* et la tomate (Reinhardt *et al.*, 2000) il a été montré que l'émergence des organes latéraux est déterminée par une concentration maximale mais transitoire d'auxine en un point, associée à l'activité des transporteurs polaires de l'auxine PIN-FORMED (PIN) (pour revue voir Krecek *et al.*, 2009). Les mutants faibles *pin1-5* produisent des fleurs affectées dans le nombre d'organes floraux démontrant la nécessité au sein du MF d'un pic transitoire d'auxine nécessaire à l'initiation des primordia floraux (Cheng *et al.*, 2007). Le métabolisme des auxines joue aussi un rôle des plus importants comme le montrent les altérations florales des mutants *yuc*, affectés dans la biosynthèse des auxines (Cheng *et al.*, 2006). La transduction du signal auxinique est aussi un élément essentiel au bon développement des MF et des organes floraux. Ainsi, de nombreux travaux rapportent l'implication des gènes *de* la famille *ARF* dans le développement floral (pour revue voir Chandler, 2016) (figure 8).

Rôle des gibberellines

L'implication des GA dans le contrôle de l'expression de l'intégrateur floral *LFY* a déjà été abordée précédemment (**figure 7 et 8**). Suite à l'induction d'*AP1*, une boucle de rétrocontrôle se met en place au sein du méristème floral par l'activation des gènes de synthèse des GA (*GA3ox*), et l'inhibition des gènes de dégradation (*GA2ox*) et de l'inhibiteur de la réponse au GA (*RGA-LIKE2*) (**Wellmer et al., 2006 et Kaufmann et al., 2010**). Les GA sont par la suite essentielles au développement des étamines et des pétales (**Koornneef et Van der Veen, 1980**).

Rôle des autres hormones

Bien que les auxines et les gibbérellines semblent être les hormones majeures impliquées dans le développement floral, les mutants affectés dans la biosynthèse ou la signalisation des CK ou de l'ABA présentent eux aussi des altérations du développement floral. La régulation du développement des anthères et du pollen est un bon exemple de l'interconnexion des différentes voies de signalisation hormonales. En effet, elle implique à elle seule les voies de signalisation des CK (**Huang et al., 2003**), des brassinostéroïdes (**Ye et al., 2010**), et de l'éthylène (**Ogawa et al., 2007**). Il est intéressant de noter que l'acide abscissique (ABA) est lui aussi impliqué dans le contrôle de la taille du méristème floral comme le démontre l'étude effectuée sur le gène *WIGGUM/ENHANCE RESPONSE to ABA1 (ERA1)* codant la sous unité β d'une farnesyltransferase impliquée dans la transduction du signal ABA (**Ziegelhoffer et al., 2000**). En effet, le mutant *wig* présente un méristème élargi se traduisant par une augmentation du nombre d'organes floraux.

Conclusion

La mise en place du méristème floral est l'aboutissement d'un réseau de régulation complexe assurant la transition entre le développement végétatif et le développement reproducteur. Suite à son apparition, il donne naissance à la plus remarquable structure présente chez les angiospermes, la fleur.

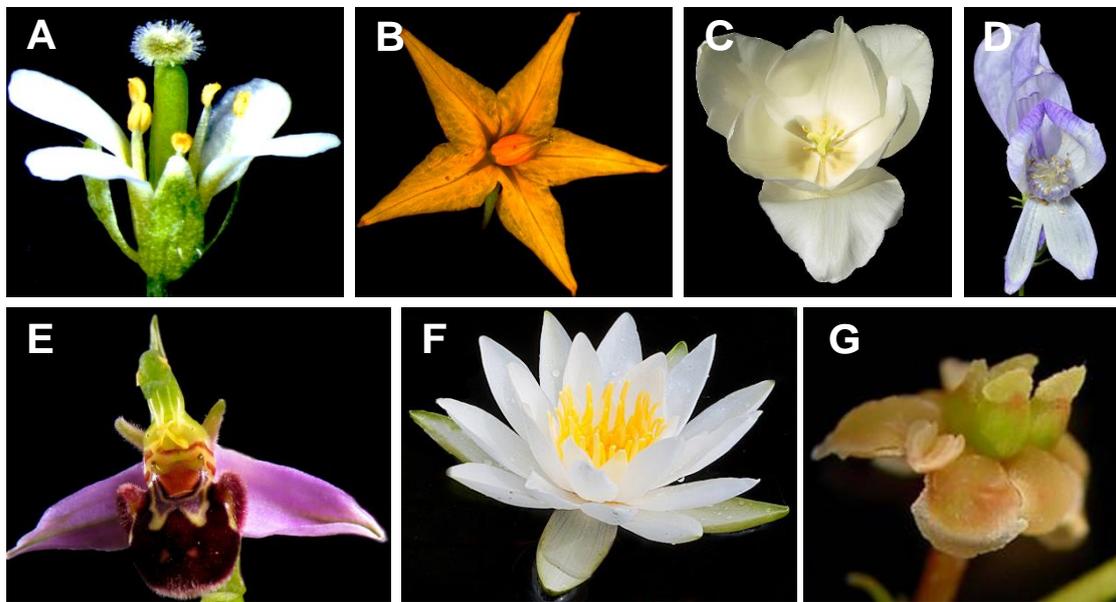


Figure 9 : Illustration de la diversité florale chez les Angiospermes

(A) *Arabidopsis thaliana*, (B) *Solanum lycopersicum*, (C) *Tulipa gesneriana*, (D) *Aconitum taigicola*, (E) *Ophrys apifera*, (F) *Nymphaea odorata* et (G) *Amborella trichopoda*

Les fleurs des angiospermes se distinguent par exemple par leur symétrie (radiale ou bilatérale), le nombre et la nature de leurs organes, etc.

Credits photos ©2001 Sangtae Kim, © 2005 Zen Sutherland, ©2008 Steve Chilton, ©2006 Francesco Cepolina, ©2009 Kirstanov

La fleur des Angiospermes : unique et diverse

L'origine et la diversification des plantes à fleurs, ou Angiospermes, ont conduit à la multitude de morphologies florales aujourd'hui observée. Cependant, leur apparition reste encore sans explication claire. A son époque, Darwin parlait d'un « abominable mystère » et l'origine de cette structure spécialisée qu'est la fleur est encore aujourd'hui inconnue. La grande majorité des innovations qui ont fait le succès de cette famille est liée à la reproduction et centrée sur la fleur (double fécondation, graines enfermées dans un carpelle, ovules à deux téguments, gamétophytes mâles et femelle réduits, etc.) (pour revue voir **Soltis et Soltis, 2014**). La fleur est un organe si important que la majorité de la diversité des espèces d'Angiosperme peut être décrite grâce aux caractéristiques de leurs fleurs (taille, forme, couleur et structure). Bien que certaines innovations soient restreintes à certains clades en particulier, la majorité peut être regroupée dans trois catégories. La première catégorie correspond à la balance entre différenciation et indifférenciation du périanthe ; un exemple est la tulipe *Tulipa gesneriana* chez laquelle la présence de tépales sur les deux premiers verticilles peut être observée (**figure 9C**). La seconde catégorie est associée à la notion de mérosité qui correspond à la variation du nombre d'organes floraux par verticille. Il est intéressant de noter que bien que l'on associe souvent les plantes à fleur à un nombre précis d'organes floraux, certaines espèces présentent un nombre irrégulier d'organes floraux, reproducteurs ou non reproducteurs, comme c'est le cas pour les plantes du genre *Amborella* (**figure 9G**). La troisième catégorie concerne la notion de symétrie florale. En effet, l'organisation des organes floraux sur la fleur varie, elle peut être zygomorphe correspondant à une symétrie bilatérale (**figure 9D et 9E**) ou actinomorphe correspondant à une symétrie radiaire (**figure 9A-B et F-G**). Ainsi, une grande diversité de caractères concernant l'architecture florale est apparue durant l'évolution des angiospermes. A cela s'ajoutent de très nombreux caractères propres aux organes floraux eux-mêmes, et il n'est pas surprenant de constater que nombre de ces adaptations concernent les organes reproducteurs femelles formant le gynécée ou pistil (pour revue voir **Gasser et Robinson-Beers, 1993**). Bien que la morphologie des gynécées chez les angiospermes soit fortement variable, plusieurs caractères communs sont souvent retrouvés. Ainsi, il est souvent constitué de trois parties, le stigmate à l'extrémité apicale du pistil, sur lequel le pollen adhère et germe, le style constitué du tissu de

Stade 1 : apparition d'un contrefort en croissance

Stade 2 : formation d'une rainure entre l'apex et la base

Stade 3 : apparition des primordias de sépales

Stade 4 : les sépales commencent à recouvrir le dôme méristématique. **La terminaison florale a lieu aux stades 3-4**

Stade 5 : apparition des primordia de pétales et d'étamine, les sépales finissent de recouvrir entièrement le bourgeon,

Stade 6 : les sépales recouvrent complètement le bourgeon, les primordia des 4 étamines médiales se forment en premier puis les 2 étamines latérales. Les primordia de pétales se forment mais restent petits. Une bordure se forme au centre, constituant un ovale qui donnera un tube creux à l'origine des deux carpelles du futur gynécée.

Stade 7 : les primordia d'étamines commencent à former le futur filet, et grandissent verticalement en même temps que le gynécée qui s'invagine en son centre. Les primordia de pétales sont toujours petits et hémisphériques.

Stade 8 : les loges des anthères deviennent visibles sur la face adaxiale.

Stade 9 : la croissance des primordia de pétales et d'étamines s'accélère. Concernant les étamines, la croissance concerne essentiellement les anthères. Le gynécée continue sa croissance en maintenant une forme de tube.

Stade 10 : il débute quand les pétales atteignent la même hauteur que les étamines latérales.

Stade 11 : il est marqué par l'apparition des papilles stigmatiques, les pétales atteignent la hauteur des étamines médiales.

Stade 12 : dernier stade du développement du bourgeon floral, l'ensemble des primordia s'allongent rapidement, les anthères atteignent leur taille finale et les filets s'allongent. Le stade 12 se termine avec l'ouverture des sépales.

Stade 13 : les pétales sont visibles entre les sépales et l'anthèse a lieu. Les filets des étamines s'allongent encore.

Stade 14 : les étamines dépassent le gynécée.

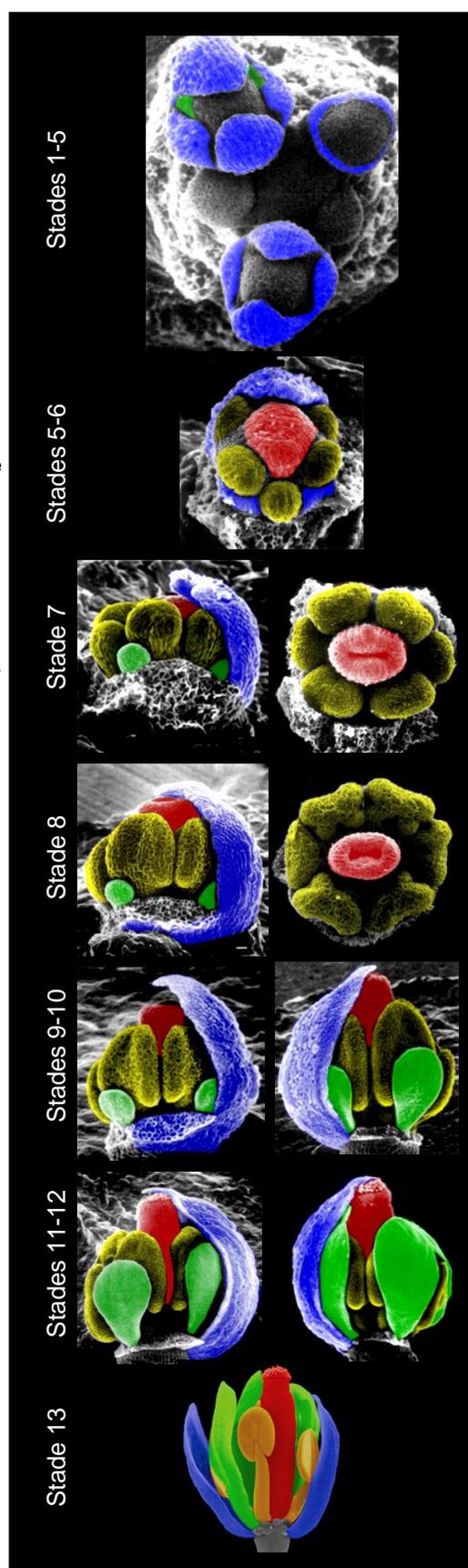


Figure 10 : Le développement de la fleur chez *Arabidopsis thaliana* (d'après Smyth *et al.*, 1990). Les sépales sont colorés en bleu, les pétales en vert, les étamines en jaune et le gynécée en rouge.

transmission à travers lequel les tubes polliniques progressent et enfin, l'ovaire, contenant les ovules et qui se différenciera en fruit après la fécondation (**Esau, 1965**). Il est intéressant de rappeler que l'apparition de l'ovule, chez les gymnospermes, précède celle du carpelle comme le montrent les analyses des fossiles (**Stewart, 1983**). Cependant, à ce jour, l'origine du carpelle fait toujours l'objet de plusieurs théories (pour revue voir **Scutt et al., 2006**).

Le développement floral chez deux espèces modèles : *A. thaliana* et *S. lycopersicum*

Notre étude s'est concentrée sur le développement de la fleur et du fruit chez deux espèces modèles. La première est *Arabidopsis thaliana*. Sa faible taille, son temps de génération court et la vaste diversité d'outils biologiques et moléculaires dont nous disposons chez cette plante en font l'espèce de choix pour l'étude du développement floral. Ainsi, les données acquises chez cette espèce enrichissent notre savoir et permettent de cibler les approches et les expérimentations les plus pertinentes, souvent plus longues et plus contraignantes, à effectuer sur les autres espèces. La seconde est un modèle pour le développement des fruits charnus, il s'agit de *Solanum lycopersicum*, la tomate. L'étude de son développement floral est d'autant plus important qu'un grand nombre des caractères agronomiques d'intérêt qui déterminent le rendement en fruit, l'un des plus consommé au monde, concernent majoritairement le développement floral et plus particulièrement, du carpelle (taille, nombre de loges, etc.).

Le développement de la fleur chez A. thaliana : description anatomique

La fleur d'*A. thaliana* se compose de quatre types d'organes floraux disposés sur quatre cercles concentriques, appelés verticilles, sur lesquels se forment respectivement, du plus externe au plus interne, quatre sépales, quatre pétales, six étamines et deux carpelles soudés. Les ovules se développent ensuite dans les carpelles.

Le développement floral d'*A. thaliana* a fait l'objet de nombreuses études anatomiques. L'article de David R. Smyth, John L. Bowman et Elliot M. Meyerowitz (**Smyth et al., 1990**) fait référence dans la description des différentes étapes de ce développement et les stades décrits

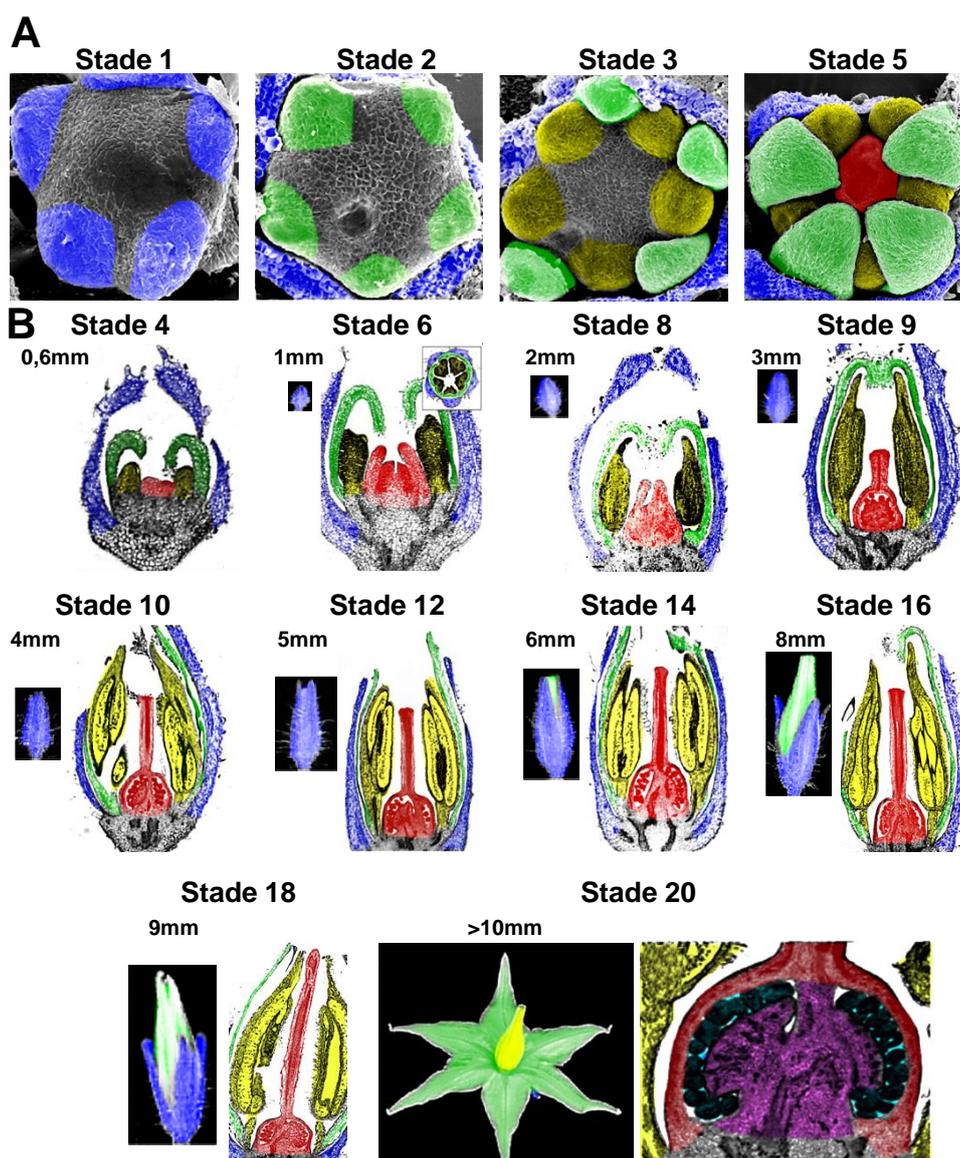


Figure 11 : Principaux événements du développement floral chez la Tomate variété WVA106 (d'après Brukhin *et al.*, 2003).

(A) Microscopie électronique à balayage.

(B) Coupes histologiques colorées au bleu de toluidine.

Stade 1 (<0.3mm) : émergence des primordia de sépales (bleu).

Stade 2 (0.3-0.4mm) : émergence des primordia de pétale (vert).

Stade 3 (0.5mm) : émergence des primordia d'étamine (jaune).

Stade 4 (0.6mm) : courbure des bordures du méristème : début du développement du carpelle (rouge).

Stade 5 (0.8mm) : formation d'une cavité centrale au sein du carpelle.

Stade 6 (1mm) : croissance des sépales en hauteur et courbure des pétales recouvrant les organes reproducteurs.

Stade 8 (2mm) : Début de fusion des carpelles.

Stade 9 (3mm) : Elongation du style et différenciation du tissu de transmission.

Stade 10 (3.5mm) : Différenciation de la cellule mère de la mégaspore (MMC) formation des tétrades dans les anthères.

Stade 12 (5mm) : Début de courbure de l'ovule et méiose de la mégaspore.

Stade 14 (6.5mm) : Développement du sac embryonnaire et des téguments, dégénérescence du tapetum et libération des microspores.

Stade 16 (8mm) : Différenciation des ovules, formation du micropyle et mitose des microspores.

Stade 18(9mm) : Fin de développement des ovules et du pollen.

Stade 20 (Ovaire) : Fin du développement floral.

sont aujourd'hui utilisés pour se référer à ces différentes étapes (**figure 10**). Ainsi, au cours du développement floral les sépales deviennent visibles au stade 3 puis les étamines au stade 4, le carpelle et les pétales au stade 5. Entre les stades 6 et 8, les organes grandissent et se différencient. Mega- et microsporogénèse débutent au stade 7 et le pollen mature rapidement avant l'anthèse au stade 13. Après la pollinisation, le développement des carpelles aboutit à la formation du fruit, une silique, tandis que les autres organes floraux dégénèrent.

Le développement de la fleur chez *S. lycopersicum* : description anatomique

La tomate est une espèce diploïde appartenant à la famille des Solanacées. Après germination et apparition des deux cotylédons, elle développe huit à dix feuilles avant une transition du méristème végétatif en méristème inflorescentiel permettant la mise en place d'une première inflorescence portant six à dix méristèmes floraux qui donneront les fleurs. Après l'apparition de cette inflorescence, trois nouvelles feuilles se formeront avant l'apparition d'une nouvelle inflorescence. Ce type de croissance est appelé croissance sympodiale. L'ensemble de cette étude ayant été effectué sur le cultivar de tomate cerise West Virginia 106 (WVA106), nous nous sommes donc intéressés à son développement (**figure 11**). Les fleurs de ce cultivar contiennent classiquement cinq sépales, cinq pétales et cinq étamines soudées en un cône entourant le pistil formé de deux carpelles soudés. Le développement de la fleur de tomate a été subdivisé en vingt stades décrivant les différentes étapes du développement floral dans l'article de référence publié par **Brukhin *et al.* (2003)**.

Histoire de l'étude du développement floral

Bien avant l'établissement des modèles modernes de régulation génétique et hormonale du développement floral, de nombreuses théories avaient été avancées pour expliquer l'origine et la formation des organes floraux. Loin de faire un historique exhaustif des descriptions et théories concernant le développement floral, cette partie traitera plus particulièrement de la théorie de la métamorphose, car cette ingénieuse hypothèse s'est vue au moins partiellement validée par les découvertes modernes.

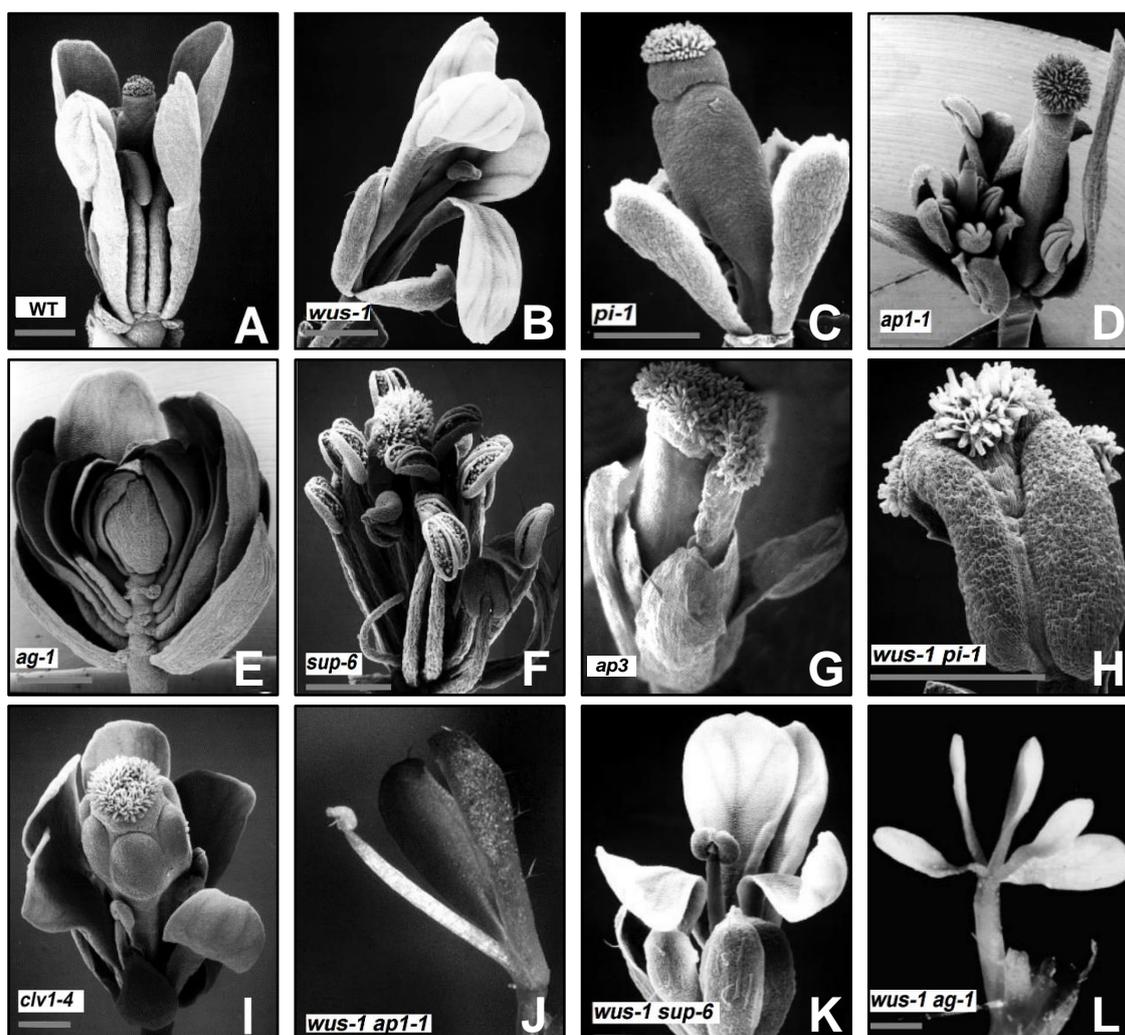


Figure 12 : Phénotypes des mutants et double mutants pour les différents gènes impliqués dans le développement floral (adapté d'après Laux *et al.*, 1996).

- (A) La plante sauvage (WT) produit des fleurs formées de quatre sépales, quatre pétales, six étamines et deux carpelles soudés.
- (B) Le mutant *wus-1* produit une fleur unique sur l'inflorescence terminale de la plante présentant quatre sépales, trois à quatre pétales et une seule étamine centrale indiquant une perte précoce d'indétermination ne permettant pas le maintien d'un nombre suffisant de cellules pour le développement complet de la fleur.
- (C) Le mutant *pi-1* présente des sépales sur le deuxième verticille remplaçant les pétales et ne présente pas d'organes floraux au niveau du troisième verticille.
- (D) Le mutant *ap1-1* présente des organes de type bractée au niveau du premier verticille ainsi que le développement d'une fleur axillaire sans qu'aucun pétale ne soit visible.
- (E) Chez le mutant *ag-1*, des pétales remplacent les étamines et de nouvelles fleurs remplacent le gynécée et ce, de manière indéterminée indiquant le double rôle du gène AG dans la fonction C et la terminaison florale.
- (F) Le mutant *sup-6* présente des étamines surnuméraires et un développement carpellaire réduit.
- (G) Le mutant *ap3* présente des sépales sur le deuxième verticille remplaçant les pétales et ne présente pas d'organes floraux au niveau du troisième verticille.
- (H) Le double mutant *wus-1 pi-1* présente des fleurs avec des carpelles doubles fusionnés.
- (I) Le mutant *clv1-4* présente une augmentation du nombre de valves lui donnant un aspect de club.
- (J) Le double mutant *wus-1 ap1-1* ne présente qu'une étamine centrale encadrée par des structures feuillées.
- (K) Chez le double mutant *wus-1 sup-1*, la fleur se termine précocement sur une étamine centrale comme chez le simple mutant *wus-1*.
- (L) Le double mutant *wus-1 ag-1* possède des fleurs terminées précocement par un pétale central.

La théorie de la métamorphose

Dès la Grèce antique, Théophraste décrit le périanthe des fleurs comme «feuillu», suggérant une origine commune des deux organes. Mais ce n'est que deux mille ans plus tard que ces hypothèses seront reprises, tout d'abord par Nehemiah Grew en 1672 (**Grew, 1672**), décrivant les «feuilles florales» en parlant du calice et de la corolle puis par de nombreux auteurs qui donneront aux organes floraux des origines variables. Bien que Linné fut incontestablement le premier à établir la notion de métamorphose pour décrire notamment la formation des organes floraux, ce sont les travaux de Goethe, énoncés dans son Essai sur la métamorphose des plantes parut en 1790 qui ancreront la théorie dans le monde scientifique (**Von Goethe, 1790**). En comparant la formation des fleurs de diverses plantes annuelles, Goethe en vient à l'hypothèse que les organes floraux sont des feuilles modifiées, aboutissant à la conclusion, « Alles ist Blatt » (« Tout est feuille »). Cette hypothèse, nous le verrons dans la partie suivante, ne s'est vue véritablement confirmée que deux cent ans plus tard, avec la découverte des gènes homéotiques responsables de l'identité des organes floraux.

Contrôle génétique de l'identité des organes floraux

Afin d'élucider les mécanismes génétiques et moléculaires du développement floral, de nombreuses études ont été réalisées sur des espèces modèles dont l'arabette des dames (*Arabidopsis thaliana*), le muflier (*Antirrhinum majus*) et le pétunia (*Petunia hybrida*). Ces études ont permis l'élaboration de modèles qui ont été complétés, confirmés ou réfutés chez d'autres espèces, améliorant notre compréhension de la biodiversité florale. L'étude de la régulation génétique du développement floral chez *A. thaliana* a commencé au début des années 1980 avec la découverte des mutants *apetala1*, *apetala2* et *agamous* chez lesquels l'identité des organes floraux est affectée (**figure 12**). C'est à la fin des années 1980 que les premières explications sont apparues quant à la fonction de ces gènes (**pour revue voir Prunet et Jack, 2014**).

Régulation génétique de l'identité des organes floraux : le modèle ABCE

L'analyse de mutants présentant des perturbations phénotypiques au niveau de la formation de la fleur a permis d'identifier les gènes impliqués dans la détermination des différents organes floraux.

Ainsi, le modèle ABC de la régulation de l'identité des organes floraux proposé par E. Meyerowitz (**Weigel et Meyerowitz, 1994**) est basé sur l'étude des mutants perte-de-fonction des gènes qui déterminent l'identité des organes floraux. Les phénotypes de ces mutants se caractérisent par la perte d'identité des organes floraux portés par deux verticilles adjacents. Le modèle ABC a été créé à partir de deux postulats : (i) les différentes combinaisons des fonctions A, B et C spécifient une identité d'organe floral unique, la fonction A spécifie les sépales, les fonctions A+B les pétales, les fonctions B+C les étamines et la fonction C seule, les carpelles et (ii) les classes A et C sont mutuellement répressives. Ainsi, en l'absence de la fonction A, la fonction C est présente dans toute la fleur et inversement (**figure 13**).

Au cours des années 1990, cinq gènes clés du modèle ABC ont été clonés et les postulats du modèle ont été confirmés par différentes expériences. Les produits des gènes (ARN ou protéines) s'accumulent dans les régions de la fleur qui sont perturbés chez les mutants. De plus, l'expression ectopique des gènes de la fonction C donne lieu à un phénotype mutant perte de fonction A validant le second postulat. Ainsi, chez *A. thaliana*, les gènes *APETALA1* (*AP1*), *PISTILLATA* (*PI*), *APETALA3* (*AP3*) et *AGAMOUS* (*AG*) participent aux fonctions A (*AP1*), B (*AP3, PI*) et C (*AG*). Ce modèle s'est enrichi par la suite, tout d'abord avec la fonction D, assurée par les gènes *SHATTERPROOF* (*SHP1* et *SHP2*) et *SEEDSTICK* (*STK*), responsables de l'identité des ovules (**Pinyopich et al., 2003**). Durant les années 2000, le modèle a été complété avec la fonction E contenant les 4 gènes *SEPALLATA1-4* qui jouent des rôles redondants pour spécifier l'identité des organes floraux. En effet, le quadruple mutant *sep1 sep2 sep3 sep4* développe des fleurs possédant des organes de type feuille, phénotype similaire au mutant pour les trois fonctions A, B et C (**Pelaz et al., 2000**) (**figure 12 et figure 18**).

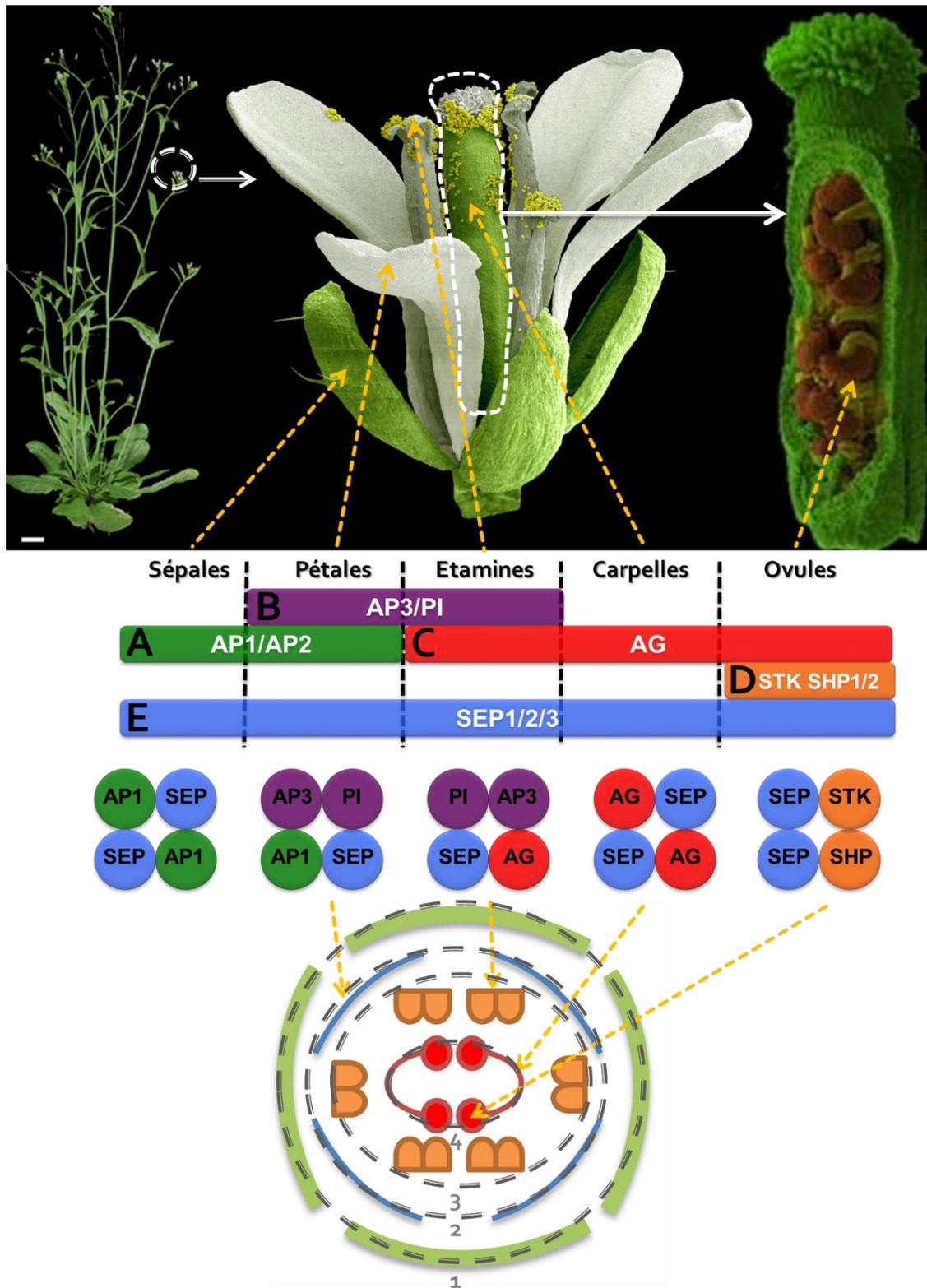


Figure 13 : Représentation schématique des modèles ABCDE et quartet à l'origine de l'identité des organes floraux chez *A. thaliana* (d'après Weigel et Meyerowitz, 1994 et Theissen et Saedler, 2001). Le postulat du modèle est le suivant : l'association des protéines codées par les gènes d'identité des organes floraux sous forme d'hétérotétramères spécifiques au sein des différents verticilles définit des fonctions contrôlant la détermination des différents organes floraux.

Un modèle moléculaire : le modèle quartet

Parmi l'ensemble des gènes gouvernant ces cinq fonctions, une grande partie code des protéines à MADS-box. Les protéines de cette famille possèdent des domaines impliqués dans l'interaction protéine-protéine et protéine-ADN. Des expériences de double hybride chez la levure ont permis de montrer que les protéines à MADS-box interagissent entre elles et forment des hétérotétramères (**Brambilla *et al.*, 2007**). C'est sur la base de l'identification des tétramères présents dans les différents organes floraux que Theissen et Saedler en 2001 ont élaboré le modèle quartet qui propose que la détermination de l'identité d'un organe floral repose sur l'association de quatre protéines à MADS-box formant un hétérotétramère spécifique (**figure 12**), induisant un programme génétique précis (**Theissen et Saedler, 2001**) et ce, en fonction de leur proportions relatives au cours du développement floral. Des expériences plus récentes ont permis de montrer que les tétramères de protéines à MADS-box assurent leur rôle en se fixant à l'ADN au niveau d'un doublet de séquences bien précises, les boîtes CARG (CC[A/T]₆GG) (**Honma et Goto, 2001**). Il a été possible de démontrer que deux dimères de protéines à MADS-box fixent les deux boîtes CARG entraînant une courbure de la séquence entre les deux boîtes, ce qui aboutit à la formation d'un tétramère. Des expériences complémentaires menées *in vivo* ont permis de confirmer la réalité de cette formation de complexes. Enfin, les travaux menés par **Smaczniak *et al.* (2012)** ont permis de valider le modèle quartet proposé par Theissen et Saedler en montrant que la concentration relative des différentes protéines à MADS-box influe fortement sur la formation des complexes (**Smaczniak *et al.*, 2012**).

Ainsi, la surexpression de l'une ou l'autre des protéines des différentes fonctions A, B, C, D ou E occasionne non seulement une présence ectopique de protéines mais aussi un effet sur la balance de concentration des protéines à MADS-box dans les différents verticilles modifiant la composition des quartets et compliquant l'interprétation des phénotypes obtenus.

De récentes études ont permis de mettre en évidence que des protéines différentes de celles à MADS-box peuvent aussi être présentes dans ces complexes, par exemple des histones déméthylases (REF6), des SWI/SNF ATPase (BRM et SYD), des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine, des co-represseurs transcriptionnels (SEUSS, LEUNIG-HOMOLOG) (**Grigorova *et al.*, 2011**) ou encore les protéines KNOTTED-like et ARF2

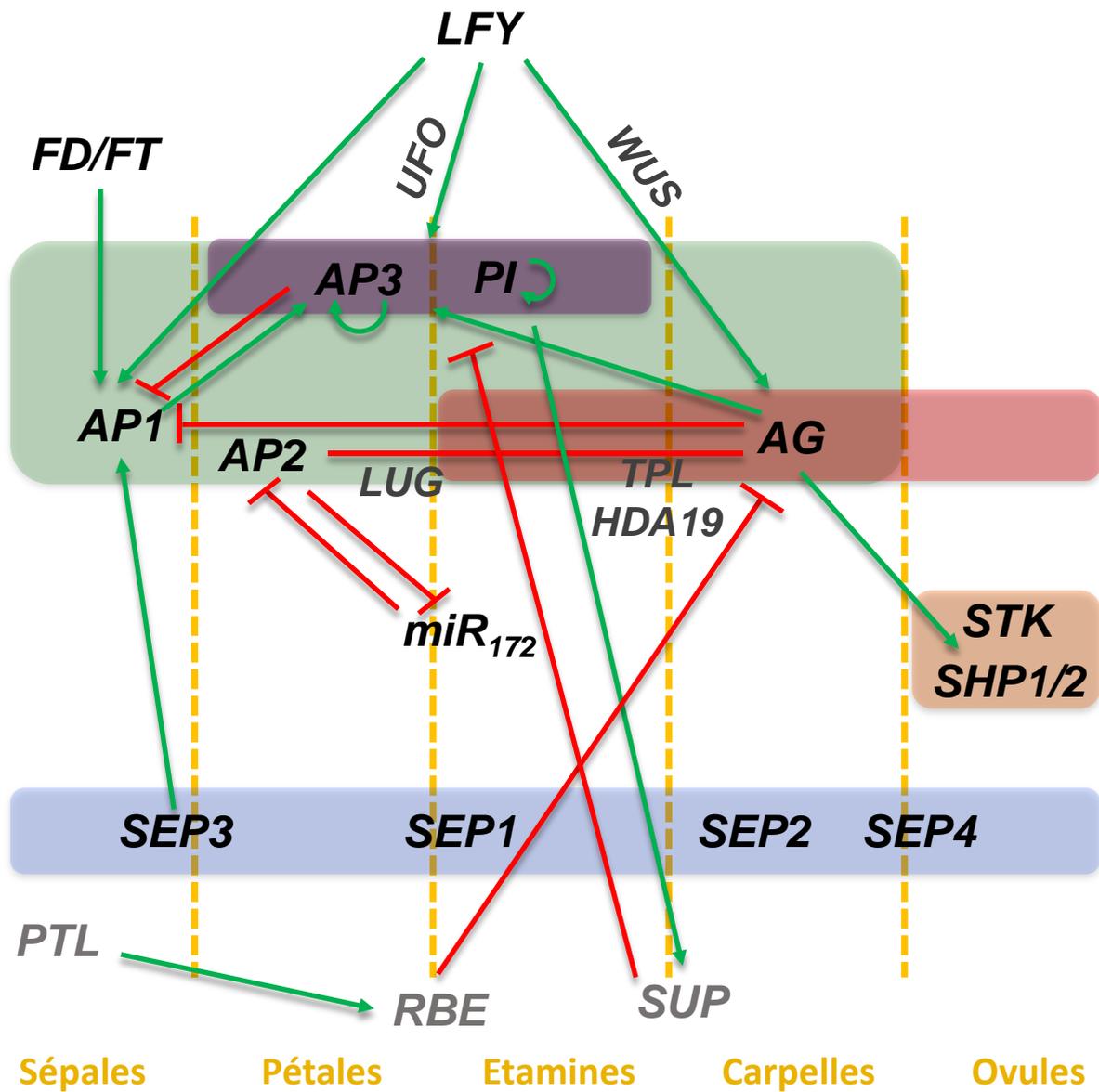


Figure 14 : Modèle simplifié de la régulation génétique du développement de la fleur chez *A. thaliana*.
 Le réseau de régulation génétique du développement des organes floraux chez *A. thaliana* est complexe et débute par l'activation des gènes d'identité des organes floraux (*AP1*, *AP2*, *AP3*, *PI*, *AG*, *STK*, *SHP1/2* et *SEP1/2/3/4*) par les gènes d'identité du MF (*LFY*, *AP1*). À leurs tours ils vont réguler et être régulés par les gènes impliqués dans la mise en place des frontières (*RBE*, *SUP*) mais aussi par de nombreux autres acteurs.

(Smaczniak *et al.*, 2012) (figure 14). Les expériences de transcriptomique, de CHIP-CHIP et CHIP-seq ont permis d'identifier des pools de gènes, cibles de fixation des protéines LFY, AP2, AP1, AG, SEP3, AP3 et PI (Pajoro *et al.*, 2014 ; Yant *et al.*, 2010 ; Kaufmann *et al.*, 2010 ; Gomez-Mena *et al.*, 2005 ; Wuest *et al.*, 2012 et Busch *et al.*, 2010). Plusieurs milliers de sites de fixation ont été mis en évidence et seulement la moitié des gènes cibles voient leur expression modifiée lors de la sur- ou sous-expression de ces facteurs de transcription. Les cibles communes permettent de valider leur fonction commune dans le développement floral. La complexité du réseau de régulation impliquant ces gènes vient de plusieurs éléments. Tout d'abord, la temporalité de la régulation est très importante, ces protéines ciblent des gènes à des moments précis du développement floral. De plus, leur action activatrice ou répressive varie bien que, dans la majorité des cas, les protéines sont soit activatrices, soit représsives. Ainsi, AP1 et AP2 sont dans la majorité des cas des répresseurs et SEP3, un activateur. À la différence de ces gènes possédant un grand nombre de cibles, WUS ne semble cibler qu'une centaine de gènes et les analyses transcriptomiques chez les plantes perte- et gain-de-fonction pour WUS révèlent que les niveaux d'expression d'une dizaine de gènes seulement varient (Yant *et al.*, 2010).

Ainsi, l'ensemble des informations abordées précédemment ont permis l'établissement de modèles de plus en plus complets mais aussi de plus en plus complexes de la régulation du développement floral (figure 14). Cependant, plusieurs informations remettent aujourd'hui en question ces modèles.

Le paradoxe des gènes de la fonction A

Dans le modèle classique, les gènes de la fonction A ont deux fonctions. La première est de spécifier l'identité des organes sépales et pétales et la seconde est de réprimer l'activité de la fonction C dans les deux premiers verticilles. En se basant sur les phénotypes des plantes mutantes correspondantes, les gènes AP1 et AP2 ont été classés dans la fonction A (Jofuku *et al.*, 1994). Cependant, concernant AP1, le phénotype ne correspond pas tout à fait au paradigme. En effet, chez le mutant *ap1*, non seulement des pétales peuvent parfois se développer, indiquant qu'il n'est pas complètement nécessaire à leur développement, mais en plus, il n'y a pas de transformation des organes des deux premiers verticilles en organes de type carpelle et étamine indiquant qu'il ne participe pas à la répression de la fonction C

(figure 15). Ainsi, *AP1* semble plutôt posséder un rôle dans l'identité du méristème. A l'inverse d'*AP1*, *AP2* est non seulement nécessaire au développement des pétales mais aussi à la répression d'*AG*. En effet, le mutant *ap2-2* se caractérise par le développement d'organes carpelloïdes sur les verticilles 1 et 2 indiquant une expression ectopique d'*AG* (**Jofuku et al., 1994**). De plus, chez ce mutant il n'y a jamais de développement de pétales et les verticilles 3 et 4 sont aussi affectés. L'expression d'*AP2* est donc importante dans tous les organes floraux pour le développement normal des organes sépales et pétales ainsi que pour la répression des gènes de la fonction C dans ces organes. Récemment, la découverte du micro-ARN miR172 a permis de donner plus d'informations quant au rôle d'*AP2*. En effet, la surexpression du miR172 donne lieu à un phénotype équivalent à celui du mutant *ap2* indiquant une relation entre le miR172 et *AP2*. *AP2* contient un site de fixation au miR172, le miR172 serait donc présent pour réguler la présence des ARNm d'*AP2*. La surexpression d'une version d'*AP2* résistante au miR172 permet de restaurer le phénotype sauvage indiquant que le miR172 empêche la traduction de l'ARNm d'*AP2* et entraîne sa destruction (**Jung et al., 2011**). La surexpression d'*AP2* engendre bien une diminution de l'expression d'*AG* mais le phénotype est plus complexe. En effet, les plantes sur-exprimant *AP2* possèdent un phénotype similaire à un double mutant *sup ag* indiquant qu'en plus d'un effet direct sur la répression des gènes de la fonction C, *AP2* aurait un effet indirect au centre de la fleur (**Sakai et al., 2000**).

Par ailleurs, la relation de restriction mutuelle des fonctions A et C est remise en question, il semblerait plutôt exister une balance entre les niveaux d'expression des gènes *AG*, *AP2* et du miR172 permettant la mise en place des organes floraux (**Zhao et al., 2007**).

Le rôle de la protéine *AP2* au niveau moléculaire a récemment été découvert en démontrant sa capacité d'interaction avec la protéine *TOPLESS (TPL)* (**Krogan et al., 2012**). En effet, *TPL* code une protéine de la famille Groucho/TUP1, qui sont des co-répresseurs transcriptionnels. *TPL* n'a pas de séquence de fixation à l'ADN mais peut interagir avec le domaine EAR (Ethylene-responsive element binding factor-Associated amphiphilic Repression domain) présent au niveau de certains facteurs de transcription à activité répressive. La protéine *AP2* possède un domaine EAR et les travaux réalisés montrent qu'elle est capable d'interagir avec *TPL* (**Krogan et al., 2012**). La relation entre ces gènes est confirmée par l'analyse phénotypique des mutants faibles *tpl* qui possèdent des changements homéotiques

de sépales en pétales indiquant une perte de la fonction A. Ainsi, il a été possible de montrer que la répression d'AG par AP2 a lieu par le recrutement de TPL et d'une histone déacétylase (HDA19) au niveau du second intron du locus AG, induisant sa répression par un mécanisme de déacétylation (**Krogan et al., 2012**). De plus, il a été montré qu'AP2 joue aussi un rôle dans la répression des fonctions B et E dans le premier verticille. Cette répression implique la protéine AP3 et nécessite la protéine TPL. En effet, non seulement, les mutants *tpl* présentent une expression ectopique des gènes *AP3*, *PI* et *SEP3* dans le premier verticille mais de plus AP2, TPL et HDA19 sont capables de se fixer aux séquences de régulation des promoteurs d'*AP3* et de *SEP3* (**Krogan et al., 2012**). Cependant, comment se fait-il que cette répression n'ait lieu que dans le premier verticille alors que les trois partenaires sont présents dans le second ? Plusieurs hypothèses sont avancées, peut-être le miR172 empêche-t-il une expression suffisante du gène *AP2* dans le second verticille pour limiter la formation du complexe, ou bien un autre gène, comme *UFO*, intervient-il pour empêcher cette répression.

Ainsi, la régulation du développement des organes floraux est un sujet d'étude particulièrement complexe et le contrôle de leur identité se fait de manière très précoce. En effet, des expériences de lignage cellulaire ont permis de montrer que chaque organe floral dérive d'un nombre réduit de cellules, huit cellules pour le sépale, deux cellules pour le pétale, quatre cellules pour l'étamine et huit cellules pour le carpelle. Les mécanismes moléculaires régulant la différenciation de ces cellules permettant de donner naissance aux organes restent donc encore largement inconnus. La mise en place des différents organes floraux en verticilles chez *A. thaliana* nous emmène logiquement à la notion de frontière entre ces organes, celle-ci faisant intervenir de nouveaux gènes régulateurs.

La régulation génétique de la mise en place des frontières

Les frontières entre chaque organe floral et entre chaque verticille sont définies comme des zones où les divisions et la croissance sont plus faibles qu'au niveau des primordia d'organes. Ces régions sont caractérisées par l'expression de gènes spécifiques tels que *SUPERMAN* impliqué dans la frontière entre le verticille 3 (les étamines) et le verticille 4 (les

carpelles) et dont l'expression est sous le contrôle des gènes des fonctions B et C (**Bowman et al., 1992**) (**figure 14**).

Le gène *SUP* code une protéine à doigt à zinc de type C₂H₂ flanquée de deux régions basiques capables de lier spécifiquement l'ADN (**Dathan et al., 2002**). *SUP* appartient à la famille TFIIIA des facteurs de transcription à doigt à zinc. Néanmoins, *SUP* possède un domaine de répression EAR à son extrémité C-terminale caractéristique des répresseurs de transcription. La surexpression d'une protéine *SUP* dont le domaine EAR est supprimé agit comme un dominant négatif indiquant que ce domaine permet à *SUP* d'agir en tant que répresseur de la transcription de gènes cible qui régulent positivement la prolifération cellulaire. L'ARNm du gène *SUP* est présent dans la partie interne du troisième verticille. Son expression apparaît juste après celle des gènes ABC et se maintient durant le développement floral.

Le mutant *sup* forme des fleurs dont les trois premiers verticilles sont normaux (**Bowman et al., 1992**) (**figure 13**). À l'intérieur du 3^e verticille, de nouveaux verticilles d'étamines sont mis en place puis au centre de la fleur se forment des organes chimères de type étamine/carpelle ainsi que des carpelles mal fusionnés. Ces phénotypes sont cohérents avec le profil d'expression du gène *SUP*. En effet, l'ARNm du gène *SUP* est présent dans la partie interne du troisième verticille. Son expression apparaît juste après celle des gènes des fonctions ABC et se maintient. Par ailleurs, le nombre d'organes floraux d'un mutant *sup* est supérieur au nombre d'organes floraux d'une fleur sauvage. Par hybridation *in situ*, il a été possible de montrer que la mutation du gène *SUP* est associée à une surexpression des gènes de fonction B *AP3* et *PI* à l'intérieur du 3^e verticille. Cependant, les expressions de ces gènes restent exclues du centre de la fleur (**Yun et al., 2002 ; Bowman et al., 1992 et Sakai et al., 2000**). Les mutants de la fonction B sont épistatiques sur le mutant *sup* indiquant que les gènes *AP3* et *PI* agissent en amont de la fonction du gène *SUP*. En effet, la surexpression du gène *AP3* seul ou avec le gène *PI* engendre un phénotype similaire à *sup* (**Prunet et al., 2009**). De surcroît, la surexpression du gène *SUP* dans les premiers verticilles sous promoteur *AP1* donne lieu à une diminution du nombre d'organes floraux et à une transformation homéotique des pétales en sépales et des étamines en carpelles liées à une diminution de l'expression d'*AP3* et d'*UFO* (**Yun et al., 2002**).

Le modèle ABC tel qu'il a été défini chez *A. thaliana* ne répond plus aujourd'hui complètement à son objectif de décrire les régulations de l'identité des organes floraux chez les eudicotylédones. En effet, chez certaines espèces, aucun mutant récessif de la fonction A n'a pu être isolé. C'est pourquoi le modèle (A)BC a été proposé. Dans ce nouveau modèle, les fonction B et C sont communes avec celles de *A. thaliana* mais la fonction A définit l'identité du méristème floral et régule les fonction B et C (**Causier et al., 2010**).

Le développement floral et la phylogénie : le modèle ABC revisité

Le modèle ABC est un bon outil pour l'étude de l'évolution de la structure florale. L'une des différences les plus marquantes que l'on peut décrire est le glissement des fonctions, ou leur gradation entre les verticilles. C'est le cas chez les tulipes, le glissement de la fonction B au niveau des verticilles externes est responsable de l'identité des tépales. Ainsi, la modification des territoires d'expression des différents gènes contrôlant l'identité des organes floraux permet d'expliquer les variations qui ont eu lieu au cours de l'évolution. Des études transcriptomiques effectuées sur quatre espèces, nénuphar, avocat, pavot de Californie et *A. thaliana*, ont permis de montrer que les différences d'expression de ces gènes pouvaient en partie expliquer la morphologie florale (**Chanderbali et al., 2010**).

L'origine phylogénétique peut parfois permettre d'expliquer les différences de fonctions. Les récentes études effectuées sur le pétunia et la tomate apportent des éléments nouveaux permettant une meilleure compréhension du réseau génétique du développement floral. En effet, depuis la définition du modèle ABC initial, de nombreux gènes ont été découverts, et de nombreuses différences peuvent être mises en évidence entre les espèces.

La fonction A chez les autres espèces

Comme mentionné plus haut, un des premiers éléments remettant partiellement en cause le modèle ABC a été l'étude des gènes portant la fonction A. Chez *A. thaliana*, cette fonction est portée par deux gènes, *AP1*, responsable de l'identité du méristème floral et intervenant partiellement dans l'identité des sépales et pétales, et *AP2*, responsable de l'identité des

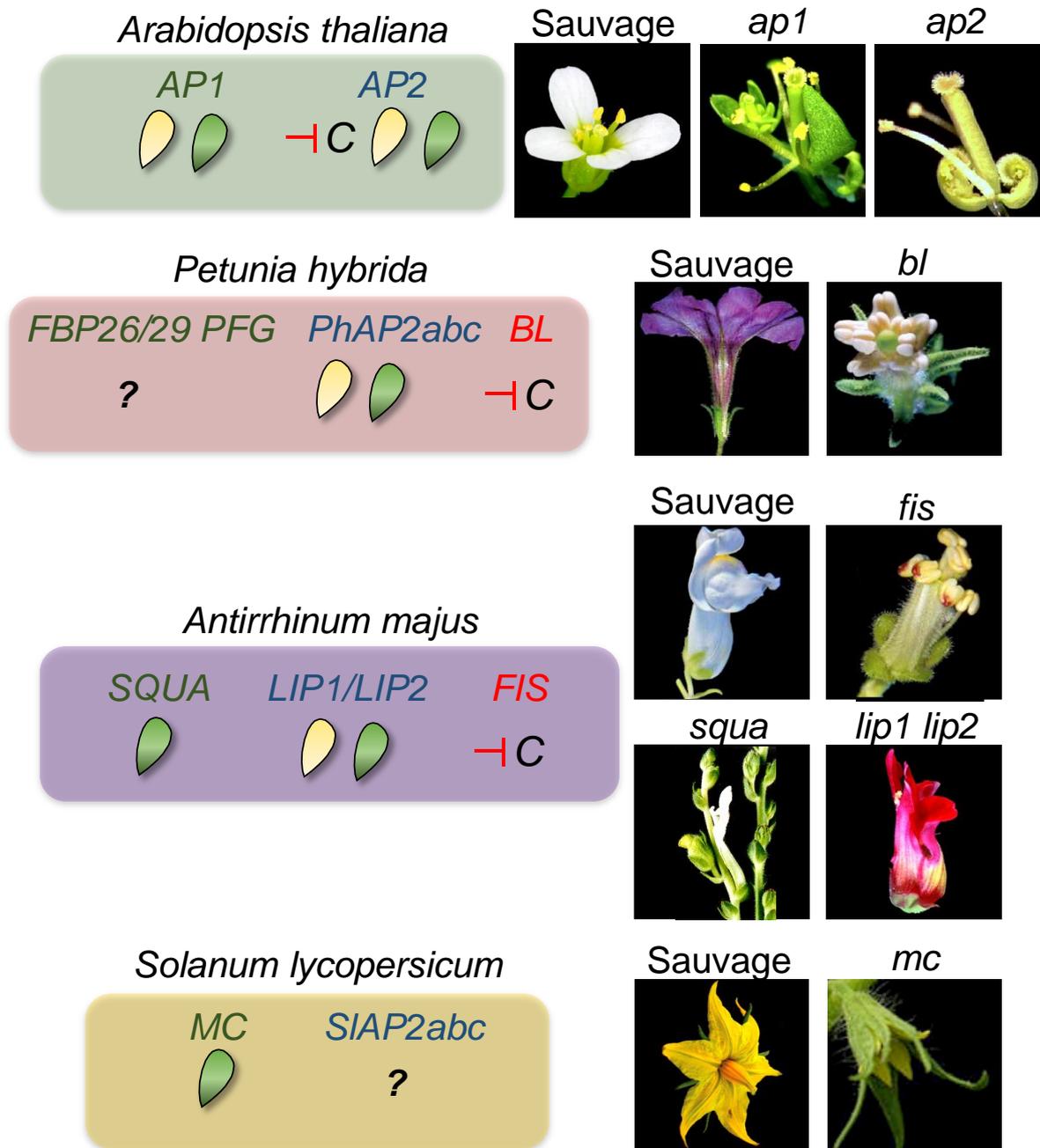


Figure 15 : La fonction A portée par les gènes *AP1* et *AP2* chez *A. thaliana* est dépendante du micro ARN *Blind* et *FIS* chez *P. hybrida* et *A. majus* respectivement (d'après Immink *et al.*, 1999 ; Irish and Sussex, 1990 ; Keck *et al.*, 2003).

Les deux gènes *AP1* et *AP2* d'*A. thaliana* se caractérisent par leur rôle dans le développement des sépales, des pétales mais aussi dans la restriction de l'expression des gènes de la fonction C.

Chez *P. hybrida* et *A. majus* la restriction de la fonction C est réalisée par les micro-ARN *Blind* et *FIS*.

Les homologues des gènes *AP1* et *AP2* chez *A. majus* *SQUA* et *LIP1/LIP2* respectivement, interviennent dans le développement des sépales, des pétales et des étamines.

Le gène *MC* chez *Solanum lycopersicum*, homologue de *AP1/SQUA*, intervient uniquement dans le développement des sépales.

pétales et sépales mais aussi de la restriction de la fonction C dans les troisième et quatrième verticilles (**figure 15**).

A la différence d'*A. thaliana*, chez le pétunia, les gènes responsables de la fonction A n'ont pas encore vraiment été caractérisés. L'identification des gènes *PhAP2a*, *PhAP2b*, *PhAP2c* (**Maes et al., 1998**), homologues d'*AP2*, tend à suggérer qu'ils interviendraient dans le développement des sépales et pétales. En effet, la surexpression de *PhAP2a* permet de restaurer le phénotype du mutant *ap2* d'*A. thaliana* (**Maes et al., 2001**). Cependant, chez le pétunia, en raison d'une possible redondance fonctionnelle de ces gènes, aucun mutant perte-de-fonction présentant des phénotypes clairs n'a pu être isolé à ce jour. Chez *Antirrhinum*, plusieurs gènes correspondant à la fonction A ont été identifiés, il s'agit des gènes *SQUAMOSA* (*SQUA*) et *LIPLESS1/LIPLESS2* (*LIP1/LIP2*) (**figure 15**). *SQUA* semble être l'orthologue d'*AP1*, il intervient comme ce dernier dans l'identité du méristème floral et des sépales (**Huijser et al., 1992**). Les gènes *LIP1/LIP2* semblent être les orthologues d'*AP2* et interviennent dans le développement des sépales et des pétales (**Keck et al., 2003**). De manière différente à *A. thaliana*, la capacité de restriction de la fonction C est assurée par le microARN *BLIND* chez pétunia et par son orthologue *FISTULATA* chez *Antirrhinum* (**Cartolano et al., 2007**). En effet, chez les mutant *bl* et *fis*, les gènes de la fonction C sont exprimés de manière ectopiques dans les verticilles externes indiquant que la fonction C n'est plus restreinte entraînant la formation de carpelles et d'étamines ectopiques (**Cartolano et al., 2007**) (**figure 15**).

Chez la tomate, très peu d'études ont été rapportées concernant les gènes impliqués dans la fonction A. Parmi les gènes identifiés, seul le gène *MACROCALYX* (*MC*), orthologue de *AP1* a été caractérisé. En effet, les mutant *mc* présentent un agrandissement des sépales ainsi qu'une perte de la détermination des inflorescences (**Vrebalov et al., 2002**) (**figure 16**). Parmi les homologues d'*AP2*, trois gènes ont été identifiés comme chez pétunia, et nommés *SIAP2a*, *SIAP2b* et *SIAP2c* (**Chung et al., 2010**). Le plus proche homologue d'*AP2* nommé *SIAP2a* a été étudié pour son implication dans la maturation du fruit (**Chung et al., 2010 et Karlova et al., 2011**) mais aucun phénotype floral n'a été rapporté dans les lignées RNAi pour ce gène. Ainsi, il semblerait que comme chez le pétunia, une redondance fonctionnelle existe entre les trois gènes.

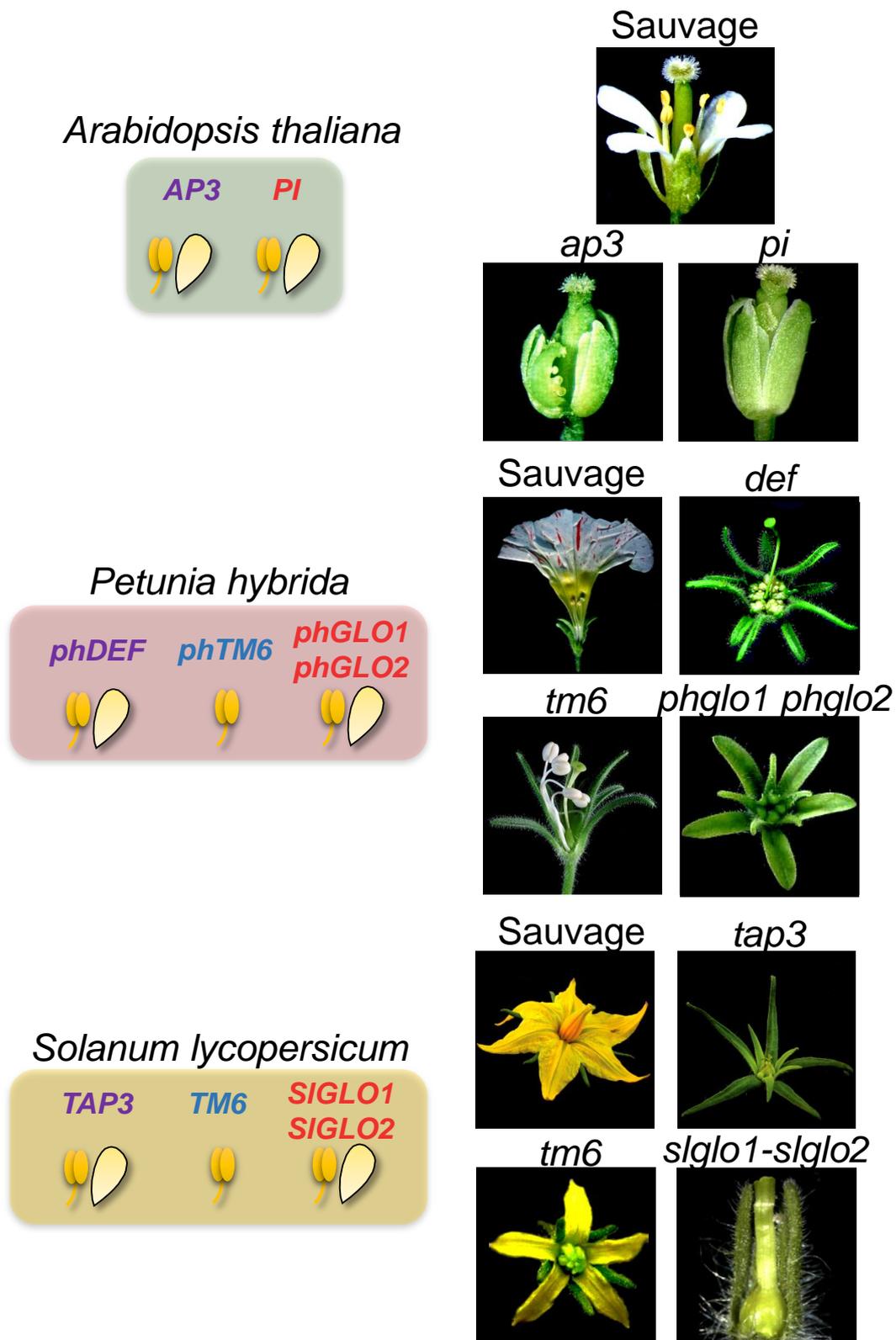


Figure 16 : Les gènes de la fonction B et leurs mutants respectifs chez *A. thaliana*, *S. lycopersicum* et *P. hybrida* (d'après Airoidi *et al.*, 2012 ; Rijpkema *et al.*, 2006 ; De Martino *et al.*, 2006 et Geuten et Irish, 2010).

Les paralogues *PI/PhGLO/SIGLO* et *AP3/DEF/TAP3* jouent des rôles similaires chez les trois espèces par leurs interventions à la fois dans le développement des pétales et des étamines.

La duplication tardive de la lignée *paléoAP3* a donné naissance aux gènes *PhTM6* et *TM6* chez *P. hybrida* et *S. lycopersicum* respectivement dont les rôles sont restreints au développement des étamines.

La fonction B chez les autres espèces

La phylogénie des gènes de la fonction B est d'un grand intérêt dans la compréhension des différences dans la régulation du développement des pétales et des étamines chez les différentes espèces. La lignée *AP3* s'est divisée en deux avant l'apparition des Angiospermes aux alentours de 280 millions d'années, donnant naissance aux paralogues *PI/GLO* et *AP3/DEF* (Airoidi *et al.*, 2012). Une duplication plus tardive de la lignée *paleoAP3/DEF* a donné d'un côté *euAP3* correspondant au seul gène présent chez *A. thaliana* et *Antirrhinum* et de l'autre *TM6* et *PhTM6* présent chez la Tomate et le pétunia. Ces deux versions se distinguent par une différence de motif protéique en C-terminal. *TM6* présente un motif en C-terminal commun avec celui trouvé dans les protéines *paleoAP3* des monocotylédones et des dicotylédones inférieures tandis qu'une mutation dans la lignée *euAP3* a remplacé ce motif par un différent. Ainsi, chez le pétunia et la tomate qui ont conservé les deux gènes, il y a une sub-fonctionnalisation permettant un contrôle indépendant du développement des étamines et des pétales (figure 16).

Le gène *TAP3* chez la tomate, homologue de *DEF* chez le pétunia, est nécessaire au développement des pétales et des étamines comme le montre le changement homéotique des pétales et des étamines en sépales et carpelles respectivement chez le mutant *tap3* (de Martino *et al.*, 2006) (figure 16). Par contre, les lignées RNAi pour *TM6* ne produisent que des étamines carpelloïdes indiquant une fonction plus spécialisée de *TM6* dans l'identité des étamines (figure 16). Concernant les gènes de la fonction B, c'est chez le pétunia que la majorité des travaux ont été effectués, mais il semblerait que la conservation des fonctions soit importante avec la Tomate.

Quand le gène *PhDEF* est muté, les pétales sont convertis en sépales mais les étamines ne sont pas modifiées, ce qui semble être dû à la redondance fonctionnelle de *PhDEF* et de *PhTM6* dans l'identité des étamines chez cette espèce (Van der Krol *et al.*, 1993) (figure 17). Cela est confirmé par le fait que la mutation des deux gènes entraîne l'apparition de fleurs ne possédant que des sépales et du carpelle. Ainsi la sub-fonctionnalisation de *PhDEF/PhTM6* proviendrait d'une modification de leur territoire d'expression lié à la perte d'un domaine conservé dans le promoteur chez *PhTM6*. Alors que *PhDEF* est majoritairement exprimé dans les deuxième et troisième verticilles, *PhTM6* possède une expression majoritaire dans les

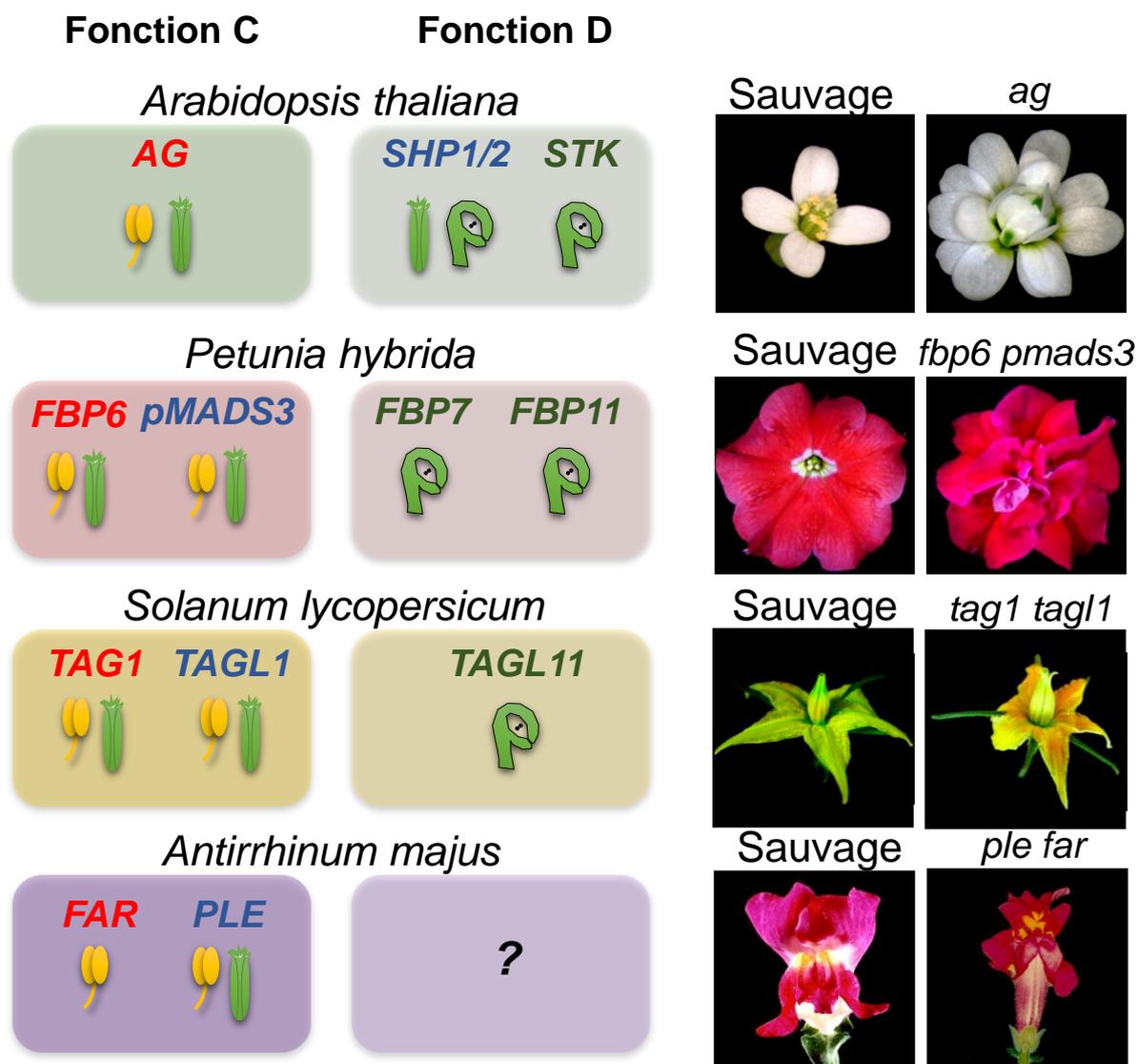


Figure 17 : Les gènes de la fonction C et D et leurs mutants respectifs chez *A. thaliana*, *P. hybrida*, *S. lycopersicum* et *A. majus* (d'après Causier *et al.*, 2005 ; Heijmans *et al.*, 2012 et Gimenez *et al.*, 2016).

La fonction C, responsable de l'identité du carpelle nécessite deux gènes qui coexistent dans la majorité des espèces, il s'agit des gènes *AG/FAR* et *PLE/SHP*. La fonction D, incluant les gènes responsables de l'identité des ovules comprend un ou plusieurs gènes proches des gènes de la fonction C.

Chez *A. thaliana*, *AG* intervient dans le développement des étamines et des carpelles ainsi que dans la terminaison florale comme le montre l'indétermination des fleurs du mutant *ag3* portant des pétales et des sépales sur un très grand nombre de verticilles. Les gènes *SHP1/2* impliqués dans le développement de la zone de déhiscence ainsi que le gène *STK* intervenant dans le développement des ovules constituent la fonction D.

Chez *P. hybrida* et *S. lycopersicum*, deux gènes (*FBP6/pMADS3* et *TAG1/TAGL1* respectivement) sont impliqués de manière redondante dans l'acquisition de l'identité des carpelles et des étamines.

Concernant la fonction D, chez *P. hybrida*, *FBP7* et *FBP11* ont une activité redondante dans la différenciation des ovules et le développement de la graine et jouent donc un rôle similaire à celui joué par *TAGL11* chez la tomate.

Chez *A. majus*, *PLE* est le gène majeur du développement du carpelle et des étamines et *FAR* joue un rôle plus restreint dans le développement des étamines. À ce jour, aucun gène n'a été identifié comme impliqué dans l'identité des ovules chez cette espèce.

troisième et quatrième verticilles. L'expression ectopique de *PhTM6* est capable de compléter le mutant *phdef* indiquant que la fonction est conservée et que les territoires d'expression ont changé (**Rijpkema et al., 2006**).

Les gènes *GLO* ont aussi subi une duplication pour donner deux gènes chez le pétunia (*PhGLO1* et *PhGLO2*) et la tomate (*SIGLO1* et *SIGLO2*), les deux étant impliqués dans le développement des pétales et étamines au sein des deux espèces. Cependant, la contribution relative des deux gènes est différente en fonction des espèces. La perte de fonction pour les deux gènes donne bien lieu à un changement homéotique de type pétales en sépales et étamines en carpelles, mais la perte de fonction d'un seul des deux gènes a donné des phénotypes moins clairs (**Vandenbussche et al., 2004** et **Geuten et Irish, 2010**) (**figure 16**).

Les fonctions C, D et E chez les autres espèces

Les gènes de la fonction C

La phylogénie des gènes de la fonction C est complexe, les études effectuées révèlent que ces gènes ont subi au cours du temps des duplications, des pertes de gène, de la sub-fonctionnalisation et de la néo-fonctionnalisation. Une duplication de l'ensemble du génome chez un ancêtre commun à nos espèces d'intérêt, il y a environ 120 millions d'années, après la divergence entre les monocotylédones et les dicotylédones, a donné lieu à l'apparition de paires de gènes issues des lignées *AG/FAR* et *PLE/SHP* (**Causier et al., 2005**).

Chez *Antirrhinum*, ces gènes ont évolué en *PLE* contrôlant le développement des organes mâle et femelle et *FAR* ayant un rôle mineur dans le développement des étamines (**figure 17**). La différence fonctionnelle entre ces deux gènes est liée à des modifications dans leur séquence protéique et le contrôle de leur expression (**Causier et al., 2005**).

Chez *A. thaliana*, les deux mêmes gènes ont suivi une trajectoire évolutive différente. *AG* joue un rôle majeur dans la spécification des organes mâle et femelle tandis que *SHP1* et *SHP2* ont un territoire d'expression plus restreint et contrôlent de manière redondante la déhiscence de la silique. Bien que ces gènes aient acquis une fonction très spécifique dans le quatrième verticille, leurs surexpressions ont permis de montrer qu'ils sont capables de contrôler le développement du carpelle et des étamines suggérant que c'est la restriction de leur territoire d'expression qui les restreint à cette fonction. La duplication des deux gènes

SHP est issue d'une duplication plus récente du génome *Brassicaceae*, qui avait aussi donné naissance à deux copies du gène *AG* mais l'une d'elle a été perdue (**Causier et al., 2005**).

A la différence des gènes *SHP* chez *A. thaliana*, la surexpression de *FAR* chez *Antirrhinum* ne permet que la spécification des étamines dans les mêmes conditions (**Causier et al., 2005 et Airoidi et al., 2010**). Cela semble indiquer qu'il y a eu des modifications dans la protéine *FAR*. Des études récentes (**Airoidi et al., 2010**) ont permis de montrer que la présence d'un acide aminé supplémentaire dans le domaine d'interaction de la protéine restreint sa capacité d'interaction avec celles de la fonction D et E.

Une autre différence majeure provient du fait que chez le pétunia comme chez le riz, le méristème floral reste actif longtemps après l'émergence du carpelle, et le placenta et les ovules proviennent du MF (tandis que chez *A. thaliana*, ils proviennent de la paroi interne du carpelle) (**Heijmans, et al., 2012**).

Tous les gènes appartenant à la famille d'*AG* interviennent dans le développement des ovules. Ainsi, les gènes de la fonction C chez le pétunia *pMADS3* et *FBP6* ou leurs homologues chez le riz, ont une fonction redondante, à la différence de chez *A. thaliana* ou *Antirrhinum* où un seul des gènes de la famille d'*AG* a pris le rôle de la fonction C (**Ferrario et al., 2004**). *FBP6* est l'orthologue de *SHP* chez pétunia, il est exprimé dans les tissus de transmission du style et le stigmate (**Kater et al., 1998 et Kapoor et al., 2002**). Aucune perte de fonction n'a encore été obtenue et sa surexpression entraîne seulement une réduction de la taille du limbe indiquant qu'il jouerait un faible rôle dans l'identité des organes reproducteurs (**Kater et al., 1998 et Heijmans et al., 2012**). *pMADS3* est exprimé dans les tissus vasculaires des étamines et du pistil puis dans les ovules, l'épiderme du pistil, le tissu non sporogénique des anthères et les nectaires (**Heijmans et al., 2012**). La perte-de-fonction *pmads3* entraîne une perte partielle de l'identité des étamines et une altération morphologique du carpelle ainsi que la production d'inflorescences secondaires au niveau du 3^e verticille (**figure 17**) (**Heijmans et al., 2012**). La surexpression quant à elle, entraîne la formation de pétales anthéroïdes et de sépales parfois carpelloïdes (**Tsuchimoto et al., 1993**).

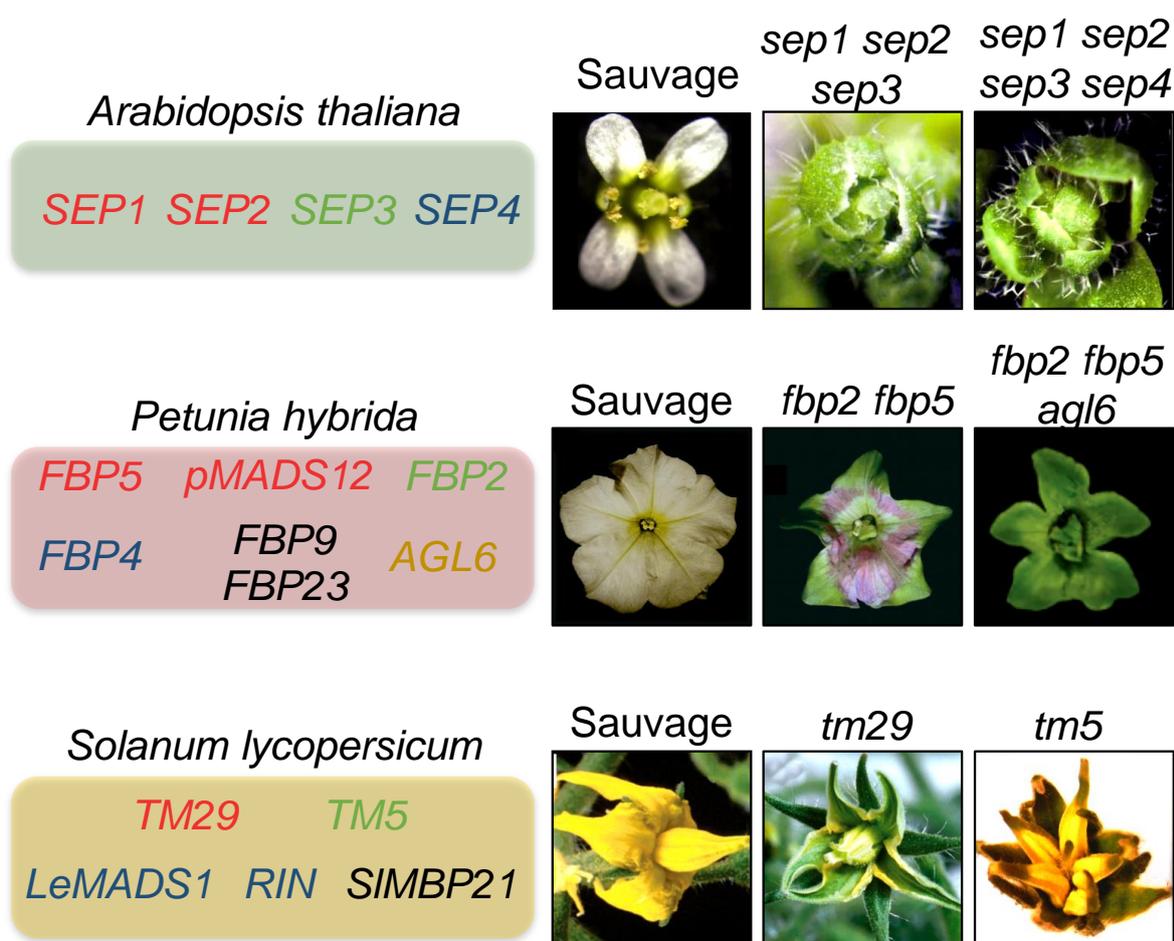


Figure 18 : Les gènes de la fonction E et leurs mutants respectifs chez *A. thaliana*, *P. hybrida* et *S. lycopersicum* (d'après Angenent *et al.*, 2003 ; Angenent *et al.*, 1994 ; Ampomah-Dwamena, 2002 ; Pnueli, 1994 ; Vandebussche *et al.*, 2003 et Liu *et al.*, 2013).

Chez *A. thaliana* le triple mutant *sep1 sep2 sep3* présente des fleurs composées uniquement de sépales, le quadruple mutant *sep1 sep2 sep3 sep4* présente des fleurs indéterminées composées d'organes ressemblant à des feuilles.

Alors qu'il est nécessaire de muter trois gènes *SEP* chez *A. thaliana* pour observer des phénotypes importants, la mutation de *FBP2* seule ou combinée aux mutations des gènes *fbp5* ou *agl6* donne lieu à d'importants phénotypes chez *P. hybrida*.

De manière équivalente, les mutations de *tm29* ou de *tm5* entraînent d'importantes altérations du développement des pétales et des étamines chez *S. lycopersicum*.

Les gènes de la fonction D

Chez le pétunia deux gènes ont été identifiés comme appartenant à la fonction D, ce sont *FBP7* et *FBP11*. Ils ont une activité redondante dans la différenciation des ovules et le développement de la graine (**Heijmans *et al.*, 2012**) (**figure 17**). De plus, ces gènes participent à la terminaison florale (**Ferrario *et al.*, 2006**), ce qui les distingue de leurs homologues chez *A. thaliana* mais cette fonction semble conservée chez la tomate avec *TAGL11* (**figure 17**). Cela peut être lié au fait que le méristème floral reste actif longtemps après l'émergence du carpelle et le placenta chez ces espèces donnant naissance aux ovules.

Les gènes de la fonction E

Chez *A. thaliana*, bien que les quatre gènes *SEP* aient été regroupés et présentent une redondance fonctionnelle partielle, un certain nombre de différences existent entre ces gènes. Ces quatre gènes sont exprimés plus tôt que les gènes des autres fonctions dans le méristème floral puis seuls les gènes *SEP1*, *SEP2* et *SEP4* sont exprimés dans les quatre verticilles tardivement. *SEP3* n'est présent que dans les trois verticilles centraux. De plus, *SEP4* est aussi exprimé dans les feuilles caulinaires suggérant un rôle dans le développement végétatif (**Ma *et al.*, 1991 ; Huang *et al.*, 1995 et Ditta *et al.*, 2004**). Les simples mutants ne présentent aucun phénotype particulier, hormis le mutant *sep3* chez lequel des fleurs axillaires se développent à la base des sépales (**Pelaz *et al.*, 2001**). Le triple mutant *sep1 sep2 sep3* présente des fleurs composées uniquement de sépales et le quadruple mutant présente des fleurs indéterminées composées d'organes ressemblant à des feuilles (**figure 18**). L'absence d'organes floraux d'aucune sorte chez ce mutant indique que les gènes des autres fonctions ont besoin des gènes de la fonction E pour permettre la différenciation des organes floraux.

Chez le pétunia et la tomate respectivement, sept gènes (*FBP5*, *FBP4*, *pMADS12*, *FBP2*, *FBP9*, *FBP23* et *AGL6*) et cinq gènes (*RIN*, *TM29*, *TM5*, *LeMADS1*, *SIMBP21*) ont été identifiés comme pouvant intervenir dans la fonction E (**figure 18**). Cependant, chez le pétunia, seule la perturbation de l'expression des gènes *FBP2* et *FBP5* et *FBP9* donne lieu à des phénotypes (**Ferrario *et al.*, 2003 et Immink *et al.*, 2003**). À la différence d'*A. thaliana*, la mutation d'un seul de ces gènes donne lieu à des phénotypes importants. La mutation de *FBP2*, qui est exprimé dans les trois verticilles centraux, engendre des altérations du développement floral, la corolle est plus petite, verte, les étamines sont transformées en structures pétaloïdes, les

carpelles ne sont pas correctement soudés, et comme chez le mutant *sep3*, des fleurs axillaires peuvent se développer à la base des sépales (**Angenent et al., 1994 et Vandenbussche et al., 2003**). Il est intéressant de noter que la surexpression de *FBP2* permet de compléter le triple mutant *sep1 sep2 sep3* d'*A. thaliana* validant l'équivalence fonctionnelle de ces gènes (**Ferrario et al., 2003**). Les fleurs du mutant *fbp5* présentent une stérilité femelle. Le double mutant *fbp2 fbp5* possède un phénotype encore plus prononcé avec une conversion des pétales en sépales, la présence de structures sépaloïdes au niveau des anthères, ainsi qu'un nombre de carpelles augmenté et non soudés (**Vandenbussche et al., 2003**) (**figure 18**). Le mutant *fbp9* présente des altérations dans l'architecture de la plante durant la phase reproductrice (**Vandenbussche et al., 2003**). Ainsi, à la différence d'*A. thaliana*, les gènes de la fonction E jouent des fonctions non-redondantes chez le pétunia.

Chez la Tomate, les cinq gènes isolés semblent jouer, tout comme chez le pétunia, des rôles spécifiques. Le gène *Ripening Inhibitor* (*LeMADS-RIN* ou *RIN*), homologue de *SEP4*, se distingue de ce dernier par son expression et sa fonction. En effet, les ARNm de *RIN* s'accumulent durant le mûrissement du fruit, et interviennent dans sa régulation comme le montre l'absence de mûrissement dans les lignées antisens (**Vrebalov et al., 2002**). Les fleurs ne présentent pas de phénotypes particuliers. Le gène *SIMBP21* appartient au même clade que *FBP9/23*, présent chez le pétunia mais absent chez *A. thaliana* (**figure 18**). Les lignées antisens et RNAi pour ce gène présentent des sépales légèrement plus grands et sont perturbées dans le développement de la zone d'abscission dans le pédicelle (**Liu et al., 2014**). *Tomato MADS Box gene 5* (*TM5*), le plus proche homologue du gène *SEP3* d'*A. thaliana* est exprimé dans les trois verticilles centraux (**Pnueli et al., 1994**). La perte de fonction pour *TM5* donne lieu au développement de fleurs aberrantes présentant des pétales sépaloïdes, des anthères et des carpelles stériles associés à une indétermination florale à l'origine d'un nombre de verticilles et d'organes floraux par verticilles augmenté. Le gène *TM29* possède une forte homologie de séquence avec *SEP1* et *SEP2* et est exprimé comme ceux-ci dans les quatre verticilles. Tout comme *TM5*, il est nécessaire au développement normal des 3 verticilles centraux comme le montre la présence de structures sépaloïdes dans ces verticilles chez les lignées antisens. Il est aussi essentiel au maintien de l'identité méristématique (**Ampomah-Dwamena et al., 2002**) (**figure 18**). En effet, chez le mutant *tm29*, on observe la formation de tiges à partir du fruit avec possible formation de feuilles et fleurs. Ce phénotype est lié au fait que le

méristème floral subit une réversion en méristème végétatif. Ainsi, à la différence du triple mutant *sep1 sep2 sep3* chez *A. thaliana* qui ne perd que l'identité du méristème floral et forme de nouvelles fleurs au niveau du quatrième verticille, il y a chez la Tomate formation de nouvelles tiges indiquant une réversion florale telle qu'elle peut être observée chez d'autres espèces telles qu'*Impatiens balsamina* (**Ampomah-Dwamena et al., 2002**). Ce phénotype peut s'expliquer par le fait que chez *A. thaliana*, la réversion florale est contrôlée par *LFY*, *AG* et les GA en condition de jours courts (photopériode non inductible) tandis que chez la Tomate, il n'y a pas d'effet de la photopériode. On peut donc supposer une régulation purement génétique par *TM29* chez la Tomate. (**Ampomah-Dwamena et al., 2002**). Chez le pétunia, ce phénotype a pu être observé chez des plantes perte de fonction pour *FBP2*, l'homologue de *SEP3* (**Angenent et al., 1994**).

La réversion florale

Chez de nombreuses espèces, un retour vers l'état végétatif est possible dans des conditions environnementales appropriées, il s'agit du mécanisme de réversion florale. Cependant, peu d'études visant à déterminer les facteurs régulateurs de la réversion florale ont été réalisées. On distingue deux types principaux de réversion, la réversion de la fleur, où le méristème floral redevient un méristème végétatif et produit de nouveau des feuilles et la réversion de l'inflorescence, où le méristème inflorescentiel cesse de produire des bractées et des méristèmes floraux pour former des feuilles et des méristèmes végétatifs axillaires. La réversion florale est intimement liée aux facteurs environnementaux (pour revue voir **Batthey et Lyndon, 1990**).

Parmi les espèces chez lesquelles la réversion de la fleur est possible, *Impatiens Balsamina* a été particulièrement étudiée. *Impatiens balsamina* est une espèce de jour court, le passage de condition appropriée à la floraison (jours courts, SD) à des conditions non inductibles (jours longs, LD) entraîne une réversion florale correspondant à un retour du méristème floral vers un méristème végétatif (**figure 19**).

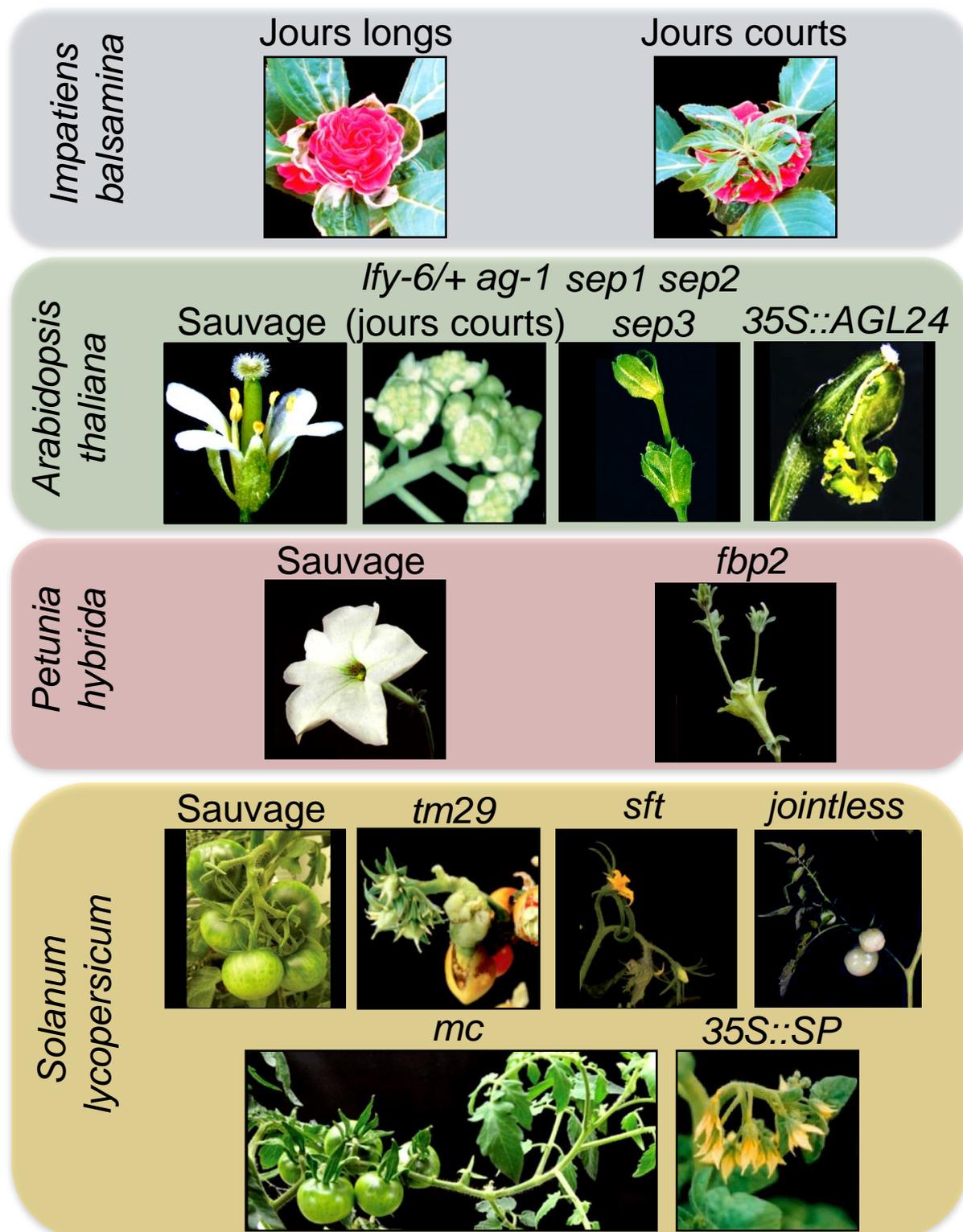


Figure 19 : La réversion florale chez *A. thaliana*, *S. lycopersicum*, *P. hybrida* et *Impatiens balsamina* (d'après Tooke *et al.*, 2005 ; Parcy *et al.*, 2002 ; Ampomah-Dwamena 2002 ; Nakano *et al.*, 2012 et Pnueli *et al.*, 1998).

Chez *Impatiens balsamina*, le passage en condition non-inductible entraîne la réversion de la fleur terminale.

Chez *A. thaliana*, les mutants *lfy-6/+ ag-1* en condition de jours courts développent des inflorescences à l'intérieur des fleurs.

Les mutants de classe E *sep1 sep2 sep3* d'*A. thaliana*, *fbp2* de *P. hybrida* et *tm29* de *S. lycopersicum* présentent une réversion florale avec le développement d'une nouvelle fleur ou inflorescence à l'intérieur du fruit.

Chez *S. lycopersicum*, de nombreux gènes interviennent dans la détermination de l'inflorescence et leur altération résulte en un retour à l'état végétatif qui peut être considéré comme un phénomène de réversion.

Régulation génétique de la réversion florale

Les analyses d'expression chez *Impatiens balsamina* des homologues de *LFY* (*Imp-LFY*) et *AP1* (*Imp-AP1*) ont montré que l'expression d'*Imp-LFY* ne change pas lors du passage en réversion florale tandis que l'expression de *Imp-AP1* est corrélée avec l'initiation du développement des pétales (**Pouteau et al., 1997**). *Imp-LFY* est donc exprimé dans le méristème végétatif ce qui correspond à ce qui est obtenu chez le Tabac bien qu'il ne soit pas associé à de la réversion florale mais diffère de chez *A. thaliana* et *Antirrhinum* où il n'est pas exprimé dans le méristème végétatif. *Imp-LFY* semble jouer un rôle dans la répartition des primordia au niveau du méristème végétatif. L'expression constitutive d'*Imp-LFY* peut s'expliquer par le fait que tout comme chez le Tabac, ou chez les mutants *tfl1/centroradialis* d'*A. thaliana*/*Antirrhinum*, la plante se termine par une inflorescence unique. Ainsi, la fonction de *TFL1/CENTRORADIALIS* serait altérée chez le Tabac et *Impatiens*. Le faible niveau d'expression d'*Imp-LFY* pourrait donc être insuffisant pour activer l'homologue d'AG chez *Impatiens* donnant lieu à une possibilité de maintien de la prolifération des cellules souches ce qui, dans des conditions adaptées, permet la réversion florale.

Chez *A. thaliana* ou la Tomate, bien que les reversions observées correspondent plutôt au développement d'inflorescences à partir des fleurs et ne sont donc pas de véritables reversions donnant lieu à un méristème végétatif développant des feuilles, les interactions génétiques qui se mettent en place sont assez similaires et ont été particulièrement étudiées (**Tooke et al., 2005**). Parmi les gènes abordés précédemment, plusieurs vont intervenir et permettre la réversion. En effet, chez *A. thaliana*, en condition de jour court, les méristèmes floraux des mutants *lfy* et *ag1* vont retourner vers un développement inflorescentiel (**Okamuro et al., 1996**) (**figure 19**) indiquant qu'AG et *LFY* sont indispensables au maintien du développement floral chez *Arabidopsis*. De la même manière, la surexpression d'*AGL24*, gène impliqué dans l'identité inflorescentielle réprimé normalement par *LFY*, va engendrer une réversion florale (**Yu et al., 2004**) (**figure 19**). De façon intéressante, ces reversions ne peuvent avoir lieu qu'en condition de jour court, ou suite à l'ajout de GA, suggérant une intervention de ces voies dans la régulation d'autres gènes intervenant dans la réversion. Au-delà de ces gènes intervenant très en amont dans l'intégration des voies de la floraison et dans l'identité du méristème floral, nous avons vu que la mutation des gènes impliqués dans l'identité des

organes floraux tels les gènes *SEP* pouvait engendrer une réversion florale et cela se retrouve chez plusieurs espèces, telles qu'*A. thaliana*, le pétunia et la Tomate. En effet, on observe chez le triple mutant *sep1 sep2 sep3* d'*A. thaliana* la formation d'une nouvelle fleur à la place du carpelle (**figure 19**). Chez le mutant *fbp2* de pétunia, on observe un phénotype identique (**figure 19**) (**Angenent et al., 1994**). Chez la Tomate, la réversion peut parfois être observée chez les plantes sauvages ; quand cela arrive, le méristème végétatif produit a un statut de méristème adulte et initie le développement d'une nouvelle inflorescence très rapidement, après la formation de seulement trois feuilles (**Bathey et Lyndon, 1990**). Le développement sympodial de la Tomate nécessite un réseau de régulation particulier. Aussi, plusieurs gènes vont intervenir dans l'identité du méristème inflorescentiel et l'initiation des méristèmes floraux et leur mutation peut engendrer des réversions florales. Un des cas les plus impressionnant correspond aux plantes perte de fonction pour le gène de la fonction E *TM29*, qui, à l'image du mutant *fbp2* de pétunia, initie la formation de nouvelles inflorescences à l'intérieur du fruit (**figure 19**) (**Ampomah-Dwamena et al., 2002**). Chez les mutants pour les gènes impliqués dans la maintenance de l'identité du méristème inflorescentiel *jointless*, *macrocalyx* et *single flower truss*, après la formation de plusieurs méristèmes floraux, le méristème inflorescentiel retourne à l'état végétatif et forme une nouvelle tige à la place de nouvelles fleurs (**Molinero-Rosales et al., 2004 et Mao et al., 2000**). La surexpression de *SELF-PRUNING*, l'homologue de *TFL1*, donne lieu elle aussi à un retour du méristème inflorescentiel vers un méristème végétatif après l'initiation de quelques fleurs (**Pnueli et al., 1998**) (**figure 19**).

Ainsi, dans le cas de plantes à inflorescence comme *A. thaliana* ou la Tomate, le méristème apical se transforme en méristème inflorescentiel capable d'initier la formation de plusieurs méristèmes floraux en maintenant un pool de cellules souches. Le développement de la fleur nécessite la mise en place d'un programme génétique particulier permettant non seulement la spécification des organes floraux mais aussi la perte de l'indétermination du méristème floral au cours d'un mécanisme appelé terminaison florale. En effet, la fleur possède un nombre fini d'organes floraux, elle a donc, à la différence du MAC, une croissance déterminée. La mise en place des patrons d'expressions génétiques aboutissant à la perte de l'indétermination méristématique fait appel à de nombreuses interactions entre différents gènes. La compréhension du réseau de régulation génétique régulant la terminaison florale

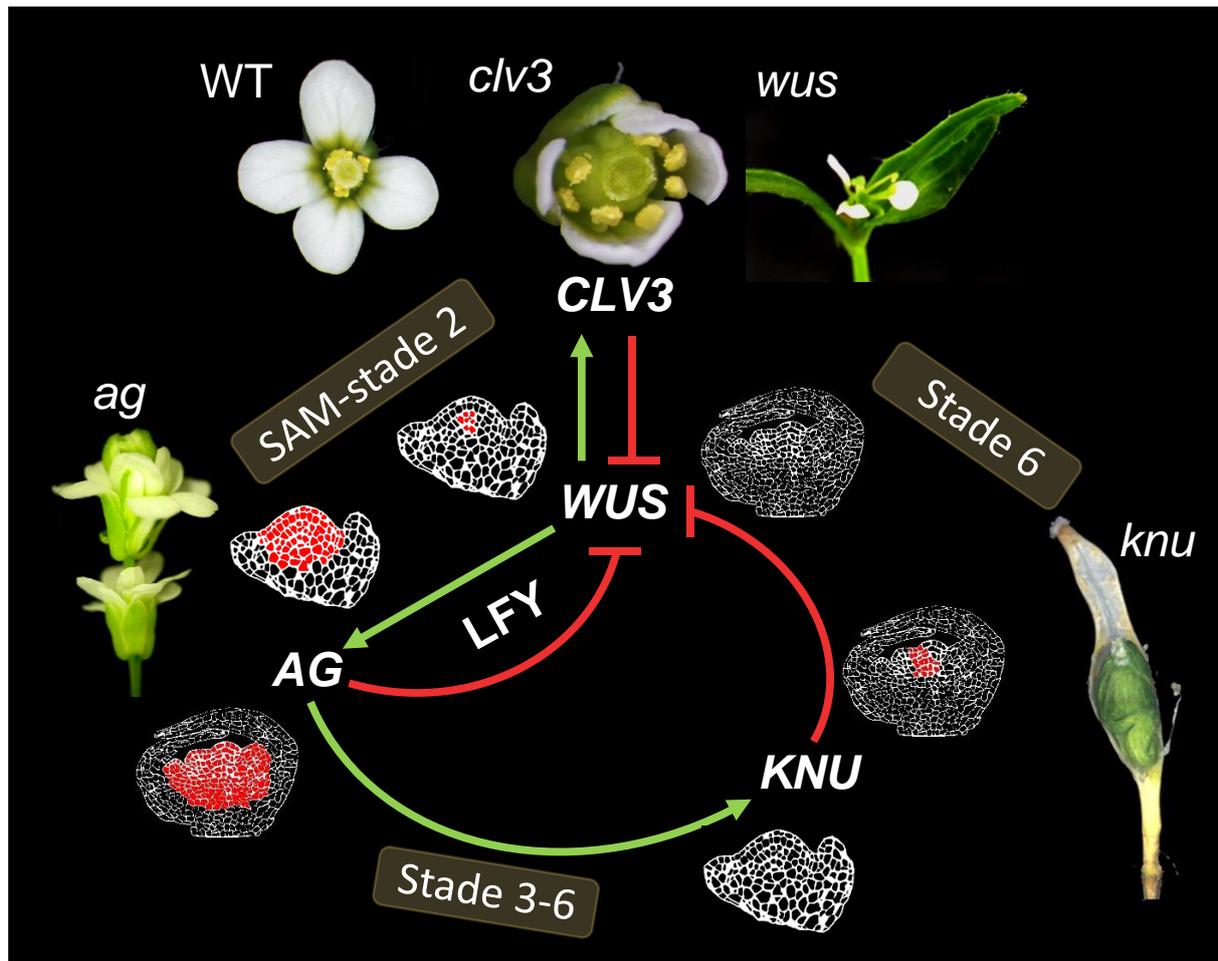


Figure 20 : Réseau génétique simplifié, territoires d'expression et phénotypes des mutants des principaux intervenants au cours de la terminaison du méristème floral chez *A. thaliana* (d'après Ito *et al.*, 2015 ; Landau *et al.*, 2015 et Payne *et al.*, 2004).

Chez le mutant *wus*, une seule fleur terminale se met en place avec une seule étamine centrale pour dernier organe floral développé.

Chez le mutant *clv3*, une augmentation du nombre d'étamines et de carpelles est observée indiquant que l'élargissement du territoire d'expression de *WUS* dans le MAC se répercute au niveau du MF.

Chez le mutant *ag3*, l'indétermination méristématique est maintenue très longtemps dans la fleur entraînant une production itérative d'organes floraux de types pétales et sépales et parfois la formation d'une nouvelle fleur à la place du gynécée.

La dissection de la silique du mutant *knu* permet d'observer le développement d'un nouveau gynécée à l'intérieur indiquant l'absence de terminaison du méristème floral.

est un prérequis nécessaire à l'étude de la mise en place et du développement du fruit, qui est un sujet central de la recherche agronomique.

La terminaison florale : régulation génétique

De nombreuses études chez la plante modèle *A. thaliana* ont permis d'isoler des mutants affectés dans le développement de la fleur et caractérisés par un dysfonctionnement du processus de terminaison florale. L'altération de la terminaison florale se traduit par une croissance indéterminée au centre de la fleur, laquelle présente un nombre d'organes plus important. L'identification des gènes affectés par ces mutations et leur caractérisation fonctionnelle ont permis de proposer un schéma de régulation de la terminaison florale.

Parmi les gènes impliqués dans la terminaison florale, le gène *WUSCHEL* (*WUS*) est un gène majeur dont l'inhibition au cours de la terminaison florale entraîne l'arrêt de l'activité méristématique. Comme vu précédemment, le mutant *wus* est caractérisé par un méristème apical défectueux (**Laux et al., 1996**). Au niveau floral, *WUS* est essentiel au bon développement de la fleur. Chez le mutant *wus*, une seule fleur terminale est mise en place et se termine précocement au niveau du troisième verticille sur une seule étamine centrale (**figure 13 et figure 20**).

L'un des principaux acteurs de l'inhibition de *WUS* est le facteur de transcription à MADS-box *AGAMOUS* (*AG*) qui, directement ou à travers l'action de différents médiateurs, va entraîner l'inhibition du gène *WUS* (**Lenhard et al., 2001**). En effet, à l'inverse du mutant *wus*, chez le mutant *ag3* la fleur conserve un état indéterminé et produit de manière continue des organes floraux (**figure 20**). Ainsi, *AG* intervient non seulement en tant que gène de la fonction C expliquant l'altération homéotique du carpelle et des étamines en pétales et sépales mais aussi en tant que répresseur de *WUS* au cours de la terminaison florale.

Rôles direct et indirect d'AGAMOUS dans la répression de WUSCHEL

De nombreux travaux ont eu pour objectif d'élucider les mécanismes sous-jacents à l'inhibition de *WUS* par *AG*.

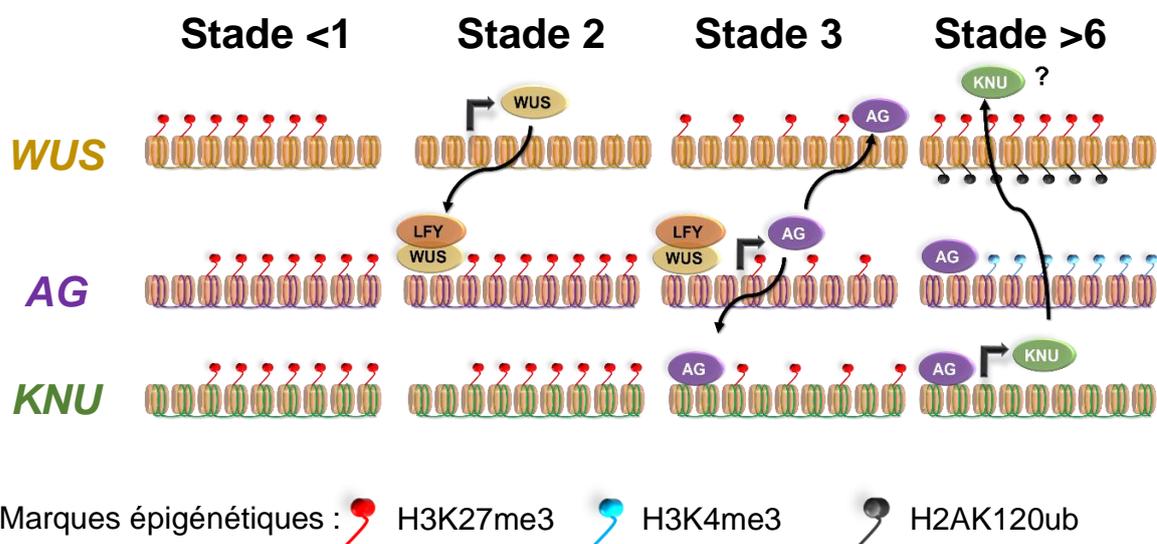


Figure 21 : Organisation temporelle de la régulation épigénétique de l'expression des trois gènes principaux, *AG*, *KNU* et *WUS*, impliqués dans la terminaison du méristème floral (d'après Sun *et al.*, 2009 ; Ito *et al.*, 2015).

Avant le stade 2, le territoire d'expression du gène *WUS* est maintenu au niveau du centre organisateur par la boucle *CLV-WUS*.

Au stade 2, l'expression du gène *AG* est induite par l'action conjointe de *WUS* et *LFY*.

Au stade 3, la protéine *AG* débute la répression de *WUS* par fixation au niveau de la région 3'UTR et le recrutement du complexe PRC2. A ce même stade, la protéine *AG* se positionne sur le promoteur du gène *KNU* induisant la disparition des marques $H_3K_{27}me_3$ permettant l'expression de ce dernier.

Au stade 6, l'expression du gène *KNU* est induite par la protéine *AG*, permettant à la protéine *KNU* d'assurer la répression complète du gène *WUS* permettant la terminaison du méristème floral.

Rôle direct : une intervention via les PcG

Récemment, les travaux de Liu *et al.*, en 2011 ont permis de démontrer l'action répressive directe d'AG sur *WUS* (Liu *et al.*, 2011). Leur étude a consisté dans un premier temps à identifier les gènes permettant d'augmenter le phénotype indéterminé dans la lignée mutante *ag-10*. Ce travail a permis de mettre en évidence le rôle du gène *CURLY LEAF (CLF)* dans le contrôle de l'indétermination méristématique. *CLF* code une protéine appartenant au complexe PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) qui intervient dans la régulation génétique par modification épigénétique au niveau des histones (ajout de marques H₃K₂₇me₃). Ainsi, ils ont pu démontrer que chez un autre mutant de ce complexe, pour le gène *TFL2 (TERMINAL FLOWER 2)*, le phénotype indéterminé d'*ag-10* était augmenté. Ces résultats suggèrent que *WUS* est une cible des PcG (Polycomb Gene) durant le développement floral. La fixation de TFL2 étant fortement réduite chez le mutant *ag-1* et la capacité de fixation d'AG sur deux boîtes CARG en 3'UTR du locus *WUS* suggère un rôle d'AG dans le recrutement des PcG pour la répression de *WUS*. Cependant, le mécanisme de recrutement des PcG par AG reste inconnu.

Ainsi, l'inhibition précoce de *WUS* est réalisée grâce au recrutement des PcG par la protéine AG entraînant une hyperméthylation des histones H3 (H₃K₂₇me₃) au locus *WUS*, aboutissant à une diminution de l'expression de *WUS* (figure 21).

Rôle indirect : intervention de KNUCKLES

Il est intéressant de noter que la surexpression constitutive d'AG n'entraîne pas de phénotype au niveau du méristème floral (Mizukami et Ma, 1997) indiquant qu'il ne peut pas assurer la répression complète de *WUS* seul par action directe. Pour permettre l'extinction complète de l'expression de *WUS* nécessaire à la terminaison florale, un deuxième gène intervient à partir du stade 6, il s'agit de *KNUCKLES (KNU)*.

KNUCKLES code une protéine à doigt à zinc de type C₂H₂ de 161 acides aminés contenant un domaine de répression de la transcription de type Ethylene-responsive element binding factor-Associated amphiphilic Repression domain (EAR) (Payne *et al.*, 2004). Le domaine EAR est retrouvé dans 219 protéines chez *A. thaliana* (Kagale *et al.*, 2010 et Kagale et Rozwadowski, 2011) dont 72% possèdent la séquence consensus LXLXL et 40% sont connus pour être des régulateurs négatifs de la transcription. Parmi ces gènes, on retrouve plusieurs

intervenants du développement floral tels que *WUS*, *SUP* et *AGL15*. Le second domaine présent chez *KNU* (C_2H_2) est quant à lui présent au sein d'au moins 56 protéines chez *A. thaliana* et a été décrit comme impliqué dans la liaison à l'ADN.

L'expression de *KNU* débute au stade 5-6 au niveau des primordia de carpelle, puis se poursuit dans les ovules et les étamines. Le mutant *knu* est dû à un changement d'acide aminé perturbant la formation du doigt à zinc et donc la fonction de *KNU*, donnant lieu à l'apparition d'organes floraux ectopiques (étamines et carpelle) d'origine placentaire (**Payne et al., 2004**). Ces organes floraux se développent de manière itérative dans la silique, donnant lieu à un phénotype de type « fleur dans le fruit » (**figure 20**) (**Payne et al., 2004**). Ce phénotype est lié au maintien de l'expression de *WUS* soulignant le rôle de *KNU* dans la répression de *WUSCHEL* au cours de la terminaison florale (**Payne et al., 2004 et Sun et al., 2009**). Chez le double mutant *ag1 knu*, un phénotype identique à *ag1* est observé. A l'inverse, la surexpression de *KNU* chez *ag* ne permet qu'une restauration partielle du phénotype. Cela suggère une relation d'épistasie d'*AG* sur *KNU*. Afin de positionner *KNU* dans le réseau génétique de la terminaison florale, le contrôle de l'expression de *KNU* a fait l'objet d'études particulièrement poussées menées par Sun et ses collaborateurs publiées en 2009 et 2014 (**Sun et al., 2009 et Sun et al., 2014**).

Ces études leur ont permis de montrer que l'expression de *KNU* est induite par fixation d'*AG* en lien avec la présence de trois boîtes CArG box au niveau du promoteur de *KNU* (**Sun et al., 2009**). Leurs travaux ont permis de démontrer que l'expression précoce de *KNU* est inhibée par des marques épigénétiques de type $H_3K_{27}me_3$ qui sont levées suite à la fixation d'*AGAMOUS* permettant ainsi l'expression de *KNU*. Cependant, l'expression de *KNU* ne débute que deux jours après le début de l'expression d'*AG* (**figure 21**). Au sein du méristème floral, la division cellulaire prend en moyenne un à deux jours (**Reddy et al., 2004**). Ainsi, le délai dans l'induction de *KNU* correspond à une ou deux divisions cellulaires. Sun et ses collaborateurs ont donc émis l'hypothèse que les marques $H_3K_{27}me_3$ pourraient être diluées par l'incorporation d'histones H3 non modifiées au cours des cycles de réplifications de l'ADN, permettant ainsi l'expression de *KNU*. Cette hypothèse a été validée en 2014 par cette même équipe (**Sun et al., 2014**). En effet, au sein du promoteur du gène *KNUCKLES* se trouvent des séquences PRE (polycomb response element) auxquelles s'associent les protéines FIE et EMF2

(composants du complexe PcG) entraînant l'apparition des marques épigénétiques H₃K₂₇me₃. Ces séquences incluent les sites de fixation à AG. Ainsi, la fixation d'AG au niveau des CARG-box du promoteur du gène *KNU* entraîne un recouvrement des séquences PRE empêchant leur accès au PRC2 donnant lieu au fur et à mesure des divisions cellulaires à une diminution des marques H₃K₂₇me₃ et à la dé-répression de l'expression de *KNUCKLES* (**figure 21**).

Ainsi, le timing dans l'induction de *KNU* au stade 6 est nécessaire au bon développement des organes reproducteurs femelles en lien avec le rôle de *KNU* dans la régulation de la prolifération des cellules souches. En effet, les constructions inducibles à la dexaméthasone *35S::KNU-GR* ont permis de montrer que *KNU* est capable de stopper précocement la prolifération des cellules souches quand il est surexprimé de manière constitutive (**Sun et al., 2009**) tandis qu'un retard dans l'expression de *KNU* se traduit par un maintien de l'indétermination. Cependant, la création de lignées comprenant un gène rapporteur sous promoteur *WUS* sans les CARG-box indique que la répression par AG reste nécessaire à l'extinction complète de *WUS*. Dans de récents travaux, il a pu être démontré que la régulation de l'expression de *KNU* faisait intervenir un autre gène, *AP2* (**Huang et al., 2016**). Ainsi, *AP2* interviendrait dans le maintien de l'expression de *WUS* au travers de deux mécanismes, la répression directe d'AG et la répression de l'expression de *KNU*. Cependant, le mécanisme par lequel *AP2* réprime *KNU* est toujours inconnu.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que les cellules du centre organisateur ne sont pas incorporées au développement du carpelle, elles restent une sous-population présente à la base du CO et gardent des propriétés méristématiques. La base du CO est le lieu où est maintenue l'expression de *KNU* qui jouerait donc un rôle dans le maintien de la répression de *WUS*, empêchant une répétition du développement floral.

L'ensemble des données d'expression et le réseau de régulation entre les trois gènes *WUS*, *AG* et *KNU* est résumé en **figure 20** et **21**.

Le mécanisme de répression de *WUS* par *KNU* reste inconnu

Comme vu précédemment, *KNU* possède un domaine EAR impliqué dans l'activité de répresseurs transcriptionnels (séquence LDLDSLRL en position 155) (**Kagale et Rozwadowski, 2011**). Ce domaine est retrouvé dans de nombreux gènes connus et comme cela a été abordé

concernant *AP2*. Les travaux effectués sur ces gènes révèlent qu'ils sont impliqués dans le recrutement de protéines de type histone déacétylase (HDA). L'interaction avec ces histones déacétylases n'est pas directe, elle requiert l'intervention d'un autre gène capable de reconnaître le domaine EAR et de se lier aux HDA. Parmi les intermédiaires connus, les protéines Sin3A Associated Protein (SAP18) et TPL ont plusieurs fois été décrites comme intervenant avec la protéine HDA19.

Il est intéressant de noter que *WUS* lui-même possède un domaine EAR impliqué dans l'interaction avec les co-répresseurs de la famille de TPL et qu'il est nécessaire à l'activité de *WUS*. En effet, les travaux effectués par B. Causier et ses collaborateurs en 2012 démontrent que l'expression d'une version tronquée de *WUS* sans son domaine d'interaction à TPL dans le mutant *wus* ne permet pas de restaurer un phénotype sauvage (**Causier et al., 2012**). De plus, l'expression d'une version chimérique formée de la fusion entre les séquences de *WUS* et de *TPL* restaure partiellement le développement floral du mutant *wus*. En effet, les plantes exprimant ces constructions présentent des fleurs avec un nombre moyen d'étamine égal à quatre et présentent parfois un carpelle formé. Il semble donc que l'interaction entre *WUS* et TPL soit nécessaire à la fonction de *WUS* notamment dans le maintien de la prolifération des cellules souches méristématiques dans le MF. De plus, plusieurs travaux rapportent l'importance de l'acétylation dans la régulation de l'expression de *WUS* lui-même. Les travaux effectués sur les mutants pertes de fonction *gcn5* (une histone acetyl-transferase) montrent une extension du territoire d'expression de *WUS* et donc une augmentation de l'expression d'*AG* (**Bertrand et al., 2003**). Ainsi, il semblerait que *GCN5* soit nécessaire à la restriction de l'expression de *WUS* dans son territoire. Par ailleurs, les analyses d'acétylation au locus *WUS* effectuées par Liu et ses collaborateurs en 2011 ont permis de montrer que l'expression de *WUS* peut être corrélée au niveau d'acétylation du locus. Ainsi, l'hypothèse d'une répression de *WUS* par KNU faisant intervenir les HDA est à envisager. L'ensemble de ces informations donnent des pistes intéressantes pour élucider le mécanisme de répression de *WUS* par KNU.

Les autres intervenants de la terminaison florale

L'analyse de l'ensemble des mutants suggère qu'à part *AG*, aucun des autres gènes n'est indispensable à la terminaison florale. L'utilisation d'une lignée mutante *ag3* transformée par une construction *35S::AG-GR* (**Ito et al., 2004**) permettant l'expression d'*AG* suite à une

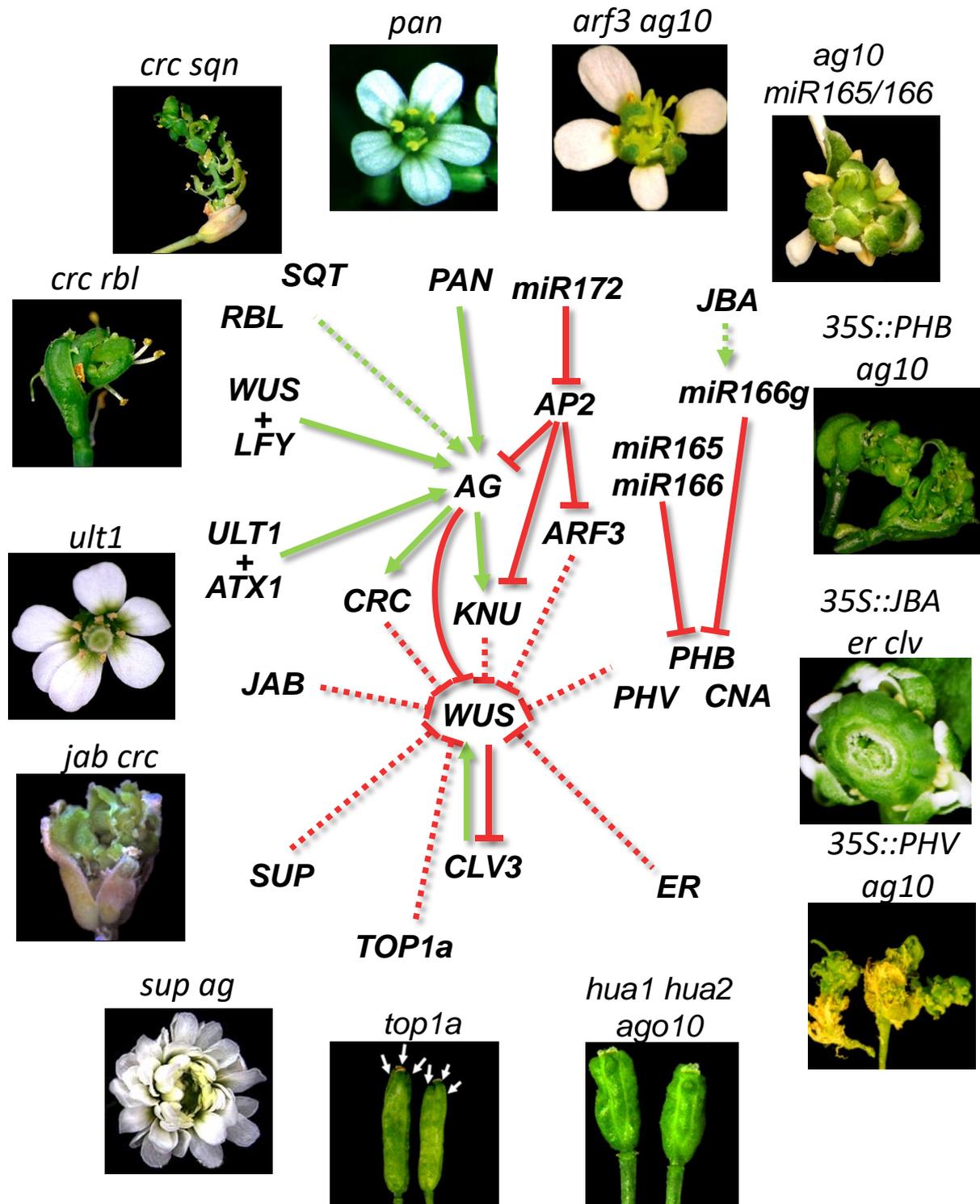


Figure 22 : Schéma récapitulatif de l'ensemble des intervenants connus de la terminaison du méristème floral et des phénotypes floraux liés à leurs dérégulations (d'après Ito et al., 2015).

induction à la dexaméthasone a permis de mettre en évidence les cibles directes d'AG (**Gomez Mena et al., 2005**). L'induction d'AG via cette construction entraîne sa fixation et des modifications d'expression de nombreux gènes parmi lesquels, bien évidemment de nombreux gènes impliqués dans le développement floral tels que *SUP*, *CRC*, *SHP*, *PI*, *SEP1-4*, *AP3* mais aussi dans la régulation hormonale telle la GA4 (**figure 22**). Ces travaux soulignent le rôle essentiel d'AG dans la régulation de l'expression d'une grande partie des gènes du développement floral expliquant l'effet très important et la complexité du phénotype du mutant *agamous*.

Cependant, à ce jour seuls deux gènes ont été décrits comme intervenant en aval d'AG, il s'agit de *KNUCKLES* que nous avons décrit précédemment et *CRABSCLAW (CRC)*. *CRC* est un gène de la famille YABBY exprimé dès le stade 5-6 au niveau de la face abaxiale du primordia de carpelle puis spécifiquement dans le carpelle et les nectaires. Son expression est directement contrôlée par AG. Il contient un domaine à doigt de zinc et un domaine HLH (YABBY domain). Le mutant *crc-1* ne présente pas d'altération du développement du méristème floral mais présente une absence de fusion carpellaire. Cependant, en combinaison avec d'autres mutants (*crc-1 spatula-2*, *crc-1 ag-1/+*, *crc-1 rbl-1*, *crc-1 sqn-4*, *crc-1 ult1-4*, *crc-1 pan-3*), il entraîne l'apparition de verticilles surnuméraires indiquant son implication dans la terminaison florale (**Prunet et al., 2009 et Zuniga-Mayo et al., 2012**). Ainsi *CRC* pourrait réguler *WUS* de manière non cellule autonome (**Bowman et Smyth, 1999 et Lee et al., 2005**).

De nombreux autres gènes interviennent dans la terminaison florale en amont ou sur des voies parallèles à AG (**figure 22**). Parmi ceux-ci, *ULTRAPETALA1 (ULT1)* déjà cité pour son rôle dans le MAC, code une protéine à domaine SAND (**Carles et Fletcher, 2009**) appartenant au groupe des protéines trithorax (trxG) pouvant interagir physiquement avec ARABIDOPSIS HOMOLOG OF TRITHORAX1 (ATX1), une H₃K₄me₃ méthyltransférase (**Carles et Fletcher, 2009**). *ULT1* est nécessaire à l'induction d'AG dans les cellules méristématiques de manière *LEAFY*-dépendante (**Engelhorn et al., 2014**). Le mutant *ult1* présente un méristème floral élargi associé à une expression de *WUS* prolongée donnant lieu à la formation de fleurs à cinq pétales (**Fletcher, 2001**). *ULT1* régule le domaine d'expression de *WUS* au sein des bourgeons floraux potentiellement via la voie de régulation *AGAMOUS-WUSCHEL* (**Carles et al., 2004**). Ainsi, par fixation au niveau de séquences régulatrices du locus AG, *ULT1* pourrait recruter

ATX1 et réguler la présence des marques H₃K₄me₃ influant ainsi sur le niveau d'expression d'AG.

Parmi les autres intervenants, *REBELOTE (RBL)* et *SQUINT (SQT)* interviendraient de manière redondante à *ULT1* dans le contrôle de la prolifération des cellules souches méristématiques (**Prunet, 2008**). *RBL* code une protéine de fonction inconnue, et *SQN* code une cyclophiline. Les doubles mutants *rbl sqn*, *rbl ult1* et *sqn ult1* montrent un défaut de terminaison florale, il y a initiation de nouveaux organes de type étamines et carpelles au centre du méristème floral en lien avec le maintien de l'expression de *WUS* (**Prunet, 2008**) (**figure 22**).

PERIANTHIA code un facteur de transcription de type bZIP contrôlant directement l'expression d'AG durant les stades précoces. Il est ensuite régulé négativement par AG (**Running et Meyerowitz, 1996 ; Chuang et al., 1999 ; Das et al., 2009 et Maier et al., 2009**). Chez le mutant *pan*, le niveau d'expression d'AG est réduit, entraînant une augmentation du nombre d'organes floraux. Chez le double mutant *lfy pan*, on note une croissance indéterminée de la fleur liée à l'absence d'inhibition de *WUS* due à l'absence d'AG (**Das et al., 2009**) (**figure 22**).

Le gène *SUPERMAN* précédemment décrit comme intervenant dans la mise en place des frontières semble lui aussi intervenir dans le processus de terminaison florale. En effet, chez le double mutant *ag-1 sup*, le méristème floral est fortement agrandi donnant lieu à des verticilles de pétales supplémentaires indiquant son intervention dans la terminaison florale sur une voie parallèle à celle d'AG (**figure 22**).

Enfin, plus tardivement en terme de développement floral, les gènes à MADS-box *SEEDSTICK (STK)* et *SHATTERPROOF1 et 2 (SHP1/2)* interviennent pour assurer une inhibition totale de l'expression de *WUS* (**Brambilla et al., 2007**). Les gènes *AGL1* et *AGL5 (SHP1 et 2)* présentent des séquences très similaires et semblent de ce fait être le fruit d'une récente duplication de gène (**Favaro et al., 2003**). Comme vu précédemment, ces deux gènes sont exprimés de manière identique au sein des nectaires, du septum, du placenta, des ovules et au niveau de la future zone de déhiscence du fruit, à la frontière entre le septum et la valve (**Flanagan et al. 1996 et Savidge et al., 1995**). *STK* présente quant à lui une expression

majoritairement au niveau de l'ovule (**Rounsley et al., 1995**). Les gènes *SHP1/2* interviennent dans la différenciation de la zone de déhiscence et dans la promotion de la lignification des cellules adjacentes permettant l'ouverture de la silique lorsqu'elle atteint la maturité. Ils participent aussi à l'identité des ovules et à la formation du style et du stigmate (**Colombo et al., 2010**). La mutation d'un des deux gènes n'a aucun effet sur le développement carpellaire tandis que le double mutant *shp1 shp2* présente une absence de déhiscence du fruit, indiquant une redondance fonctionnelle de ces deux gènes (**Colombo et al., 2010**). La surexpression de *SHP1* permet d'induire la formation d'ovules sur des sépales transformés en structures «carpelloïdes». La surexpression de *SHP2* complémente la mutation d'*AG*, indiquant une redondance fonctionnelle des gènes *AG* et *SHP* (**Pinyopich et al., 2003**). Chez le quadruple mutant *ap2 shp1 shp2 ag*, toutes les structures carpellaires y compris les ovules, ont disparues. Ainsi *SHP* est nécessaire au développement carpellaire de manière indépendante d'*AG*.

La mutation de *STK* a pour conséquence le développement de graines viables qui ne se détachent pas du fruit (**Pinyopich et al., 2003**). Le triple mutant *stk shp1 shp2* présente des défauts de développement de l'ovule avec parfois une conversion des ovules en carpelles. La surexpression de *STK* chez le mutant *ag3* entraîne la formation d'organes carpelloïdes indiquant que l'activité de *STK* dans l'induction de la formation de ces structures ne passe pas exclusivement par *AG*. Il joue aussi un rôle important dans la différenciation de la zone de déhiscence au niveau de la marge valvaire permettant l'ouverture de la silique lorsqu'elle atteint la maturité.

Il est intéressant de noter qu'une perte de détermination florale est aussi observée chez les mutants *hua* et *hen*. Cela est lié au fait que les preARNm d'*AG* subissent une étape d'épissage dépendant de *HUA1*, *HUA2* et *HEN2/HEN4*, donnant lieu à des phénotypes similaires au mutant *ag* chez les mutants *hua* et faisant de ces gènes des intervenants de la terminaison florale (**Chen et al., 2002 et Cheng et al., 2003**) (**figure 22**).

La régulation de l'ensemble de ces gènes se fait de manière mutuelle mais aussi par le biais de l'intervention des microARN. Le miR172 favorise la terminaison florale en réduisant la quantité d'ARNm d'*AP2*, ce dernier jouant un rôle dans la répression d'*AG* (**Chen, 2004**). En effet, la surexpression d'une version résistante d'*AP2* au miR172 donne lieu à une perte totale

d'indétermination (**Chen, 2004 et Zhao *et al.*, 2007**). De la même façon, la surexpression des miR165/166 dans un fond mutant *ag-10* donne lieu à une croissance indéterminée des organes floraux (**Ji *et al.*, 2011**) (**figure 22**).

De manière intéressante, l'étude de l'ensemble des gènes impliqués dans la terminaison florale montre un lien important entre développement des organes reproducteurs femelles et terminaison florale. En effet, un grand nombre des gènes participant au développement carpellaire sont impliqués dans la terminaison florale. Cependant, de manière intéressante, ces deux programmes peuvent être découplés. En effet, il semblerait que la terminaison florale nécessite une quantité d'AG plus importante que l'identité carpellaire. Cela a pu être montré par **Ó'Maoiléidigh *et al.*, (2013)** via des expériences d'induction de l'expression d'AG à différents temps. Leurs expériences montrent que l'induction précoce d'AG suffit à assurer le développement carpellaire tandis que l'action prolongée d'AG est nécessaire pour le développement des étamines et leur maturation (**Ó'Maoiléidigh *et al.*, 2013**). Par ailleurs, le fait que certains mutants non affectés dans l'identité des organes floraux aient une perte de détermination florale va aussi dans le sens d'un découplage entre le développement du fruit et la terminaison florale (*sqn ult1, hua1 hua2 ago*) (**Ji *et al.*, 2011**) (**figure 22**).

Ainsi, les différentes études ont permis d'identifier un grand nombre d'acteurs mais le réseau de régulation génétique intervenant au cours de la terminaison florale reste incomplet. La mise en évidence de nouveaux acteurs doit permettre de compléter les connaissances du processus de terminaison florale dont le contrôle constitue un enjeu agronomique intéressant. En effet, l'inhibition, au moins partielle, du processus de terminaison florale se traduit chez certains mutants par une augmentation du nombre de carpelles et généralement de la taille du fruit.

Régulation génétique et hormonale du développement du fruit

Au-delà de leur incroyable diversité florale, les angiospermes se caractérisent aussi par une très grande diversité des fruits. Bien que les deux espèces étudiées, *A. thaliana* et la Tomate, présentent de grandes similitudes florales, leurs fruits sont des plus différents.

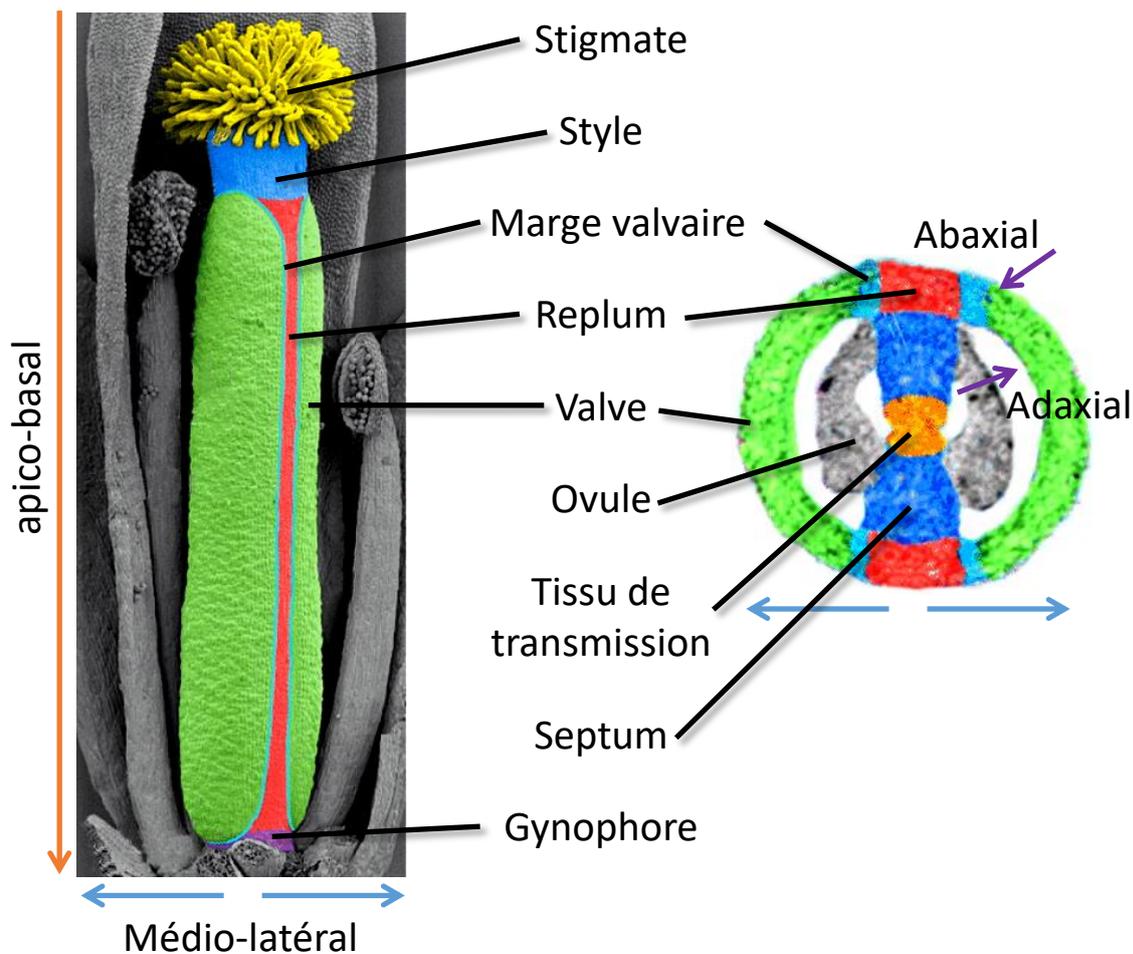


Figure 23 : Organisation du gynécée chez *A. thaliana* (d'après Seymour et al., 2013).

Le gynécée d'*A. thaliana* s'organise selon différents plans de symétries (apico-basal, médio-latéral et abaxial-adaxial). L'ovaire, lié à la base de la fleur par le gynophore, se compose de deux carpelles soudés surmontés par le style accueillant le tissu de transmission nécessaire au passage des tubes polliniques et lui-même coiffés par le stigmate dont les papilles stigmatiques permettent la réception du pollen. Les valves issues de la paroi ovarienne sont séparées par le *septum* dont la partie exposée à l'extérieur se nomme le *replum*.

En effet, *A. thaliana* présente un fruit sec déhiscent appelé silique, formé de deux valves issues des deux carpelles soudés de la fleur. Chez la Tomate, l'ovaire donne naissance à une baie, un fruit charnu, qui chez les espèces aux fruits les plus simples, comprend deux loges issu des deux carpelles soudés formant initialement le gynécée de la fleur. La formation du fruit débute donc dès l'initiation des primordia carpellaires et va nécessiter, chez les deux espèces, la mise en place d'un programme génétique particulier associé à plusieurs voies de régulations hormonales.

Le développement de la silique chez A. thaliana

Le pistil d'*A. thaliana* se compose de différentes parties. A sa base se distingue un entre-noeud court, appelé *gynophore* qui relie le pistil à la base de la fleur. Au-dessus de celui-ci se trouve l'ovaire contenant entre 50 et 80 ovules. Les parois de l'ovaire sont appelées des valves et sont séparées longitudinalement en deux loges par un *septum*. La partie extérieure du *septum* est appelée *replum*. A l'extrémité apicale de l'ovaire se trouve le style et le stigmate (**figure 23**). Nous l'avons vu précédemment, suite à leur émergence, les carpelles vont acquérir leur identité majoritairement par le biais du gène de la fonction C *AGAMOUS* ainsi que des gènes de la fonction D *SHP1/SHP2*. Ainsi, les gènes *SHP1/2* et *AG* semblent être les plus en amont de la voie de régulation de l'identité carpellaire, et contrôlent d'autres gènes tel que *CRC* précédemment cité pour son intervention dans la terminaison florale (**figure 24**).

Mise en place des axes de polarité

Une fois l'identité carpellaire spécifiée, différents domaines vont se différencier par la mise en place d'axes de polarité abaxial-adaxial, medio-latéral et apico-basal. En raison de la similarité avec le schéma de développement de la feuille, la polarité abaxiale-adaxiale va impliquer des mécanismes génétiques similaires à ceux qui ont lieu dans la feuille. En effet les gènes *HD-ZIPIII* vont s'exprimer dans la partie adaxiale du carpelle tandis que les gènes *KAN/YAB* s'exprimeront dans la partie abaxiale permettant la polarisation (**Eshed et al., 1999**). D'autres gènes, tels que *JAG*, *NUB* ou encore *ETT* et *ARF4* vont intervenir dans l'acquisition de cette polarité de manière redondante (**Dinneny et al., 2006 et Kerstetter et al., 2001**). En effet, chez les doubles mutants *crc kan1*, *kan1 kan2* et *ett arf4*, le tissu de transmission et les ovules se forment à l'extérieur du gynécée. La polarité medio-latérale est aussi déterminée très tôt lors du développement du gynécée. La partie médiale forme un tissu méristématique

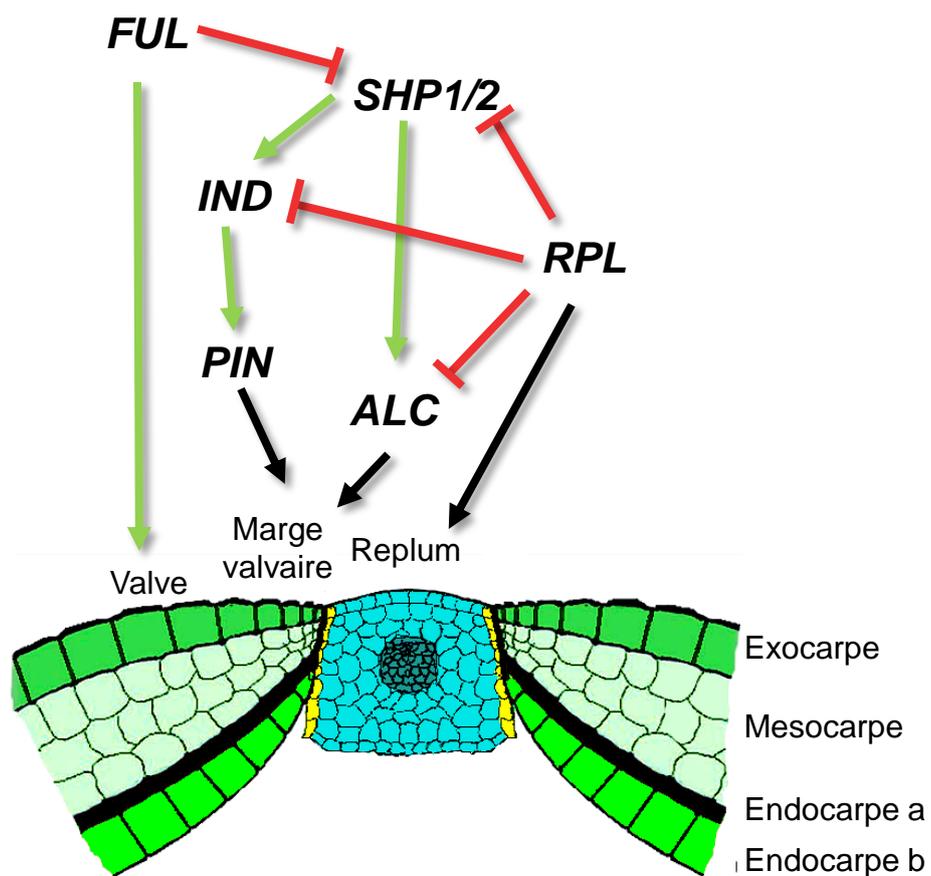


Figure 24 : Réseau génétique impliqué dans le développement de la région valve-replum de la silique d'*A. thaliana*.

La déhiscence de la silique à maturité nécessite une régulation fine du développement des différents tissus composant la région valve-replum. L'étude des mutants affectés dans son développement a permis d'établir le réseau génétique ci-dessus.

appelé la crête médiane qui donnera naissance au placenta, au septum au style et au stigmat, tandis que les parties latérales vont se développer en tissus différenciés qui donneront les valves. Etant donné le statut méristématique de la crête médiane, le réseau génétique qui y a lieu est très similaire à celui du MAC. En effet, les gènes *KNOX* et les gènes de frontière *CUC1* et *CUC2* y sont spécifiquement exprimés (**Aida et al., 1999**). Les auxines jouent aussi un rôle particulièrement important dans la mise en place des différents domaines du gynécée, notamment via un gradient apico-basal (**Nemhauser et al., 2000**) mais aussi, nous l'avons vu, via l'intervention de plusieurs gènes dont *ETT* et *ARF4*. Récemment, des travaux ont permis de montrer que les auxines jouent aussi un rôle dans la polarité abaxiale-adaxiale via un gradient dans les valves (**Sorefan et al., 2009**).

Régulation génétique du développement de la frontière valve-replum

Les domaines latéraux du gynécée vont donner naissance aux valves formant la paroi ovarienne et aux marges valvaires formant la bordure entre le replum et la valve. Ces structures sont de toute première importance puisque responsables de l'ouverture de la silique à maturité, nécessaire à la dispersion des graines. Elles sont formées de deux couches : la couche de séparation, contenant des cellules à paroi mince sécrétant des enzymes engendrant la digestion de la lamelle moyenne et ainsi la séparation des cellules, et la couche lignifiée, assurant la mise en tension et permettant la séparation des valves. Aussi, la mise en place des marges valvaires nécessite un programme génétique très précis et fait intervenir de nombreux gènes. Les gènes *SHP1* et *SHP2* précédemment décrits comme appartenant à la fonction D, jouent un rôle redondant dans la différenciation des couches de séparation et lignifiée (**Liljgren et al., 2000**). Leur nom provient du fait que les graines sont emprisonnées dans la silique en lien avec une indéhiscence causée par l'absence de mise en place de la marge valvaire. Les gènes *SHP1/2* agissent par l'activation d'autres gènes, les gènes *ALCATRAZ* et *INDEHISCENT*. *ALCATRAZ* est un facteur de transcription de la famille des bHLH exprimé au niveau de la marge valvaire. Chez le mutant *alcatraz*, les siliques sont indéhiscents (**Rajani et Sundaresan, 2001**) en lien avec une perturbation du développement de la couche de séparation dont les cellules ne se détachent pas en lien avec la formation d'une couche lignifiée. *INDEHISCENT* est aussi un facteur de transcription de la famille des bHLH et contrôle la spécification des couches de séparation et lignifiée.

Régulation génétique du développement des valves

Le développement des valves quant à lui est bien moins connu, il semble majoritairement en lien avec l'activité d'AG et d'un autre gène à MADS-box, le gène *FRUITFULL*. En effet chez le mutant *ful* la différenciation des valves n'a pas lieu correctement (**Gu et al., 1998**) et en plus de son rôle dans la différenciation, il intervient aussi dans le contrôle de la lignification par répression des gènes *SHP*, *ALC* et *IND*.

Régulation génétique du développement du replum

A l'image de la méconnaissance des facteurs impliqués dans le développement des valves, le développement du replum est lui aussi très mal connu. L'un des seuls gènes identifié correspond au gène *REPLUMLESS (RPL)* codant une protéine à homéodomaine appartenant à la famille de *BELL1*. Chez le mutant *rpl*, le replum ne se différencie pas, les cellules à son origine chez les plantes sauvages prennent une identité de marge valvaire chez le mutant *rpl* marquées par une expression ectopique de *SHP*, *ALC* et *IND* (**figure 24**). Le replum n'est qu'un des tissus formant la partie médiale, le septum et le tissu de transmission vont aussi être impliqués dans la fusion du gynécée. Deux évènements de fusion ont lieu lors du développement du gynécée. Le premier correspond à la fusion des deux carpelles (**Bowman et al., 1999**). En effet, bien que le gynécée se forme en un seul primordium, il est constitué de deux carpelles soudés. Le second correspond à la fusion des crêtes médianes pour former le septum et à la fusion du style. Après cette fusion, le tissu de transmission se différencie. Plusieurs gènes sont importants dans ces évènements tels que *LEUNIG (LUG)*, *TOUSLED (TSL)*, *STYLISH (STY)*, *SPATULA (SPT)* et *CRC*. *LUG* code un co-répresseur ne contenant pas de domaine de fixation à l'ADN. Il est impliqué précocement dans le développement floral en tant que répresseur d'AG au sein de verticilles 1 et 2 de la fleur (agissant de concert avec un autre facteur appelé *SEUSS*). Il possède également un rôle dans le développement du gynécée car le mutant *lug*, en plus d'une transformation homéotique partielle des organes du premier verticille en carpelles, présente un défaut de développement du gynécée (**Liu et Meyerowitz, 1995**). On observe une croissance anormale des valves en forme de cornes à l'apex ; les deux carpelles sont mal fusionnés ; peu d'ovules sont mis en place et le style et le stigmate ne sont pas situés à l'apex des valves mais sur la partie abaxiale du septum seulement, en lien sans doute avec un défaut de croissance des crêtes médianes. Le mutant *ant* présente quant à lui

un gynécée anormal avec des papilles stigmatiques moins nombreuses et un septum souvent mal fusionné (**Eliott et al., 1996 et Klucher et al., 1996**). Les deux mutants *lug* et *ant* ont des phénotypes proches liés à l'atteinte des tissus marginaux entraînant un défaut de fusion des deux carpelles. Chez le double mutant *lug ant*, les carpelles sont constitués uniquement d'une valve en forme de corne au sommet et aucun tissu marginal n'est observé (**Liu et al., 2000**). Ainsi, les deux gènes *LUG* et *ANT* contrôlent la mise en place des tissus marginaux. *STYLISH 1* et *STYLISH2* (*STY1* et *STY2*) codent des protéines ayant un domaine RING impliqué dans la liaison du zinc. Ils participent de manière redondante au développement du style et du stigmate. *STY1* est impliqué dans la régulation du gène *YUCCA4* responsable de la synthèse d'auxine au niveau apical du gynécée (**Sohlberg et al., 2006**). Chez le mutant *tousled*, la différenciation du style et du stigmate est réduite et on observe une perturbation de la fusion du style et du septum. *TSL* code une sérine thréonine kinase nucléaire dont le rôle semble lié à la régulation du métabolisme de la chromatine (**Ehsan et al., 2004**). Le développement du tissu de transmission est aussi dépendant d'un autre gène, *SPT*. Le mutant *spt* présente un défaut de développement des tissus marginaux lié à un défaut de croissance des crêtes médianes. Le tissu de transmission est réduit ; les papilles sont moins abondantes et le septum est mal fusionné à l'apex du gynécée (**Alvarez et Smyth, 1999**). Il est exprimé dans la région médiane du gynécée puis dans les tissus dérivés des crêtes médianes mais également au niveau de la zone périphérique des méristèmes apicaux (**Heisler et al., 2001**). *SPT* code un facteur de transcription de type bHLH exprimé au niveau de la marge valvaire et du tissu de transmission au niveau du style participant ainsi à son développement. *SPT* est régulé négativement dans les régions abaxiales du gynécée au cours de son développement par l'effecteur de la voie auxinique ETTIN (**Balanza et al., 2006**). Le mutant *crc* présente comme son nom l'indique, une absence de fusion du style et de la partie haute de l'ovaire qui résulte en la formation de deux organes en pince de crabe mais aussi une absence de nectaires et des fruits plus petit et plus large que chez les plantes sauvages. Ainsi, en plus de son rôle dans l'acquisition de la polarité abaxial-adaxial, *CRC* joue aussi un rôle important dans la fusion du tissu de transmission.

L'ensemble des gènes décrits précédemment joue des rôles spécifiques, partiellement redondants et parfois synergiques dans le développement des différents domaines du gynécée d'*A. thaliana*. Ils sont en interrelation fine avec la régulation hormonale, notamment

auxinique mais aussi gibbérellique, hormone jouant un rôle clé dans le développement post-fécondation.

Importance de la fécondation dans le développement du fruit

L'initiation du développement du fruit dépend généralement de la fertilisation. Chez *A. thaliana*, en absence de pollinisation, on observe un arrêt du développement du gynécée et une senescence puis abscission de la fleur (**Vivian-Smith et Koltunow, 1999**). Après fécondation, de complexes interactions vont s'établir entre la graine en formation et le fruit afin d'assurer leurs développements simultanés. Cette communication entre la graine et le fruit passe majoritairement par les voies hormonales et à la différence du développement précoce impliquant en majorité les auxines, implique surtout les GA. En effet, on observe chez le mutant de synthèse des gibbérellines *ga1-3* une absence de développement de la silique après fécondation (**Vivian-Smith et Koltunow, 1999**), et chez le mutant *ga5-1* une diminution des divisions et de l'expansion cellulaires dans les valves nécessaire à l'allongement de la silique. Chez *A. thaliana*, les GA ont aussi fait l'objet de nombreuses études concernant leur effet sur la parthénocarpié et sur la longueur de la silique.

Contrôle du nombre de carpelle

En tant qu'élément d'intérêt agronomique majeur notamment dans le cas des fruits charnus, le contrôle génétique du nombre de carpelles se doit d'être étudié des plus finement. Les carpelles sont les derniers organes floraux formés dans la fleur, leur nombre est donc directement dépendant du pool de cellules souches maintenu dans le méristème floral. En effet, comme abordé précédemment, et à la différence d'espèces comme le riz et le pétunia, chez *A. thaliana*, l'activité du MF s'arrête après l'émergence des carpelles. Ainsi, chez les mutants affectés dans la taille du MF, tels que les mutants *clv*, plus de carpelles sont formés (**Clark et al., 1995**). D'autres gènes tels que *POLTERGEIST (POL)* et *STM* interviennent dans la taille du méristème et en conséquence dans le nombre de carpelles. En effet, les plantes hétérozygotes pour *STM* ou surexprimant *POL* suppriment partiellement le phénotype *clv3* en diminuant le nombre de carpelles. Cependant, en raison de leur implication dans la maintenance du MAC, les gènes cités précédemment seraient difficiles à employer en amélioration génétique, l'impact de la perturbation de leur expression sur le développement de la plante étant très important. Pour cela, les gènes impliqués dans le développement floral

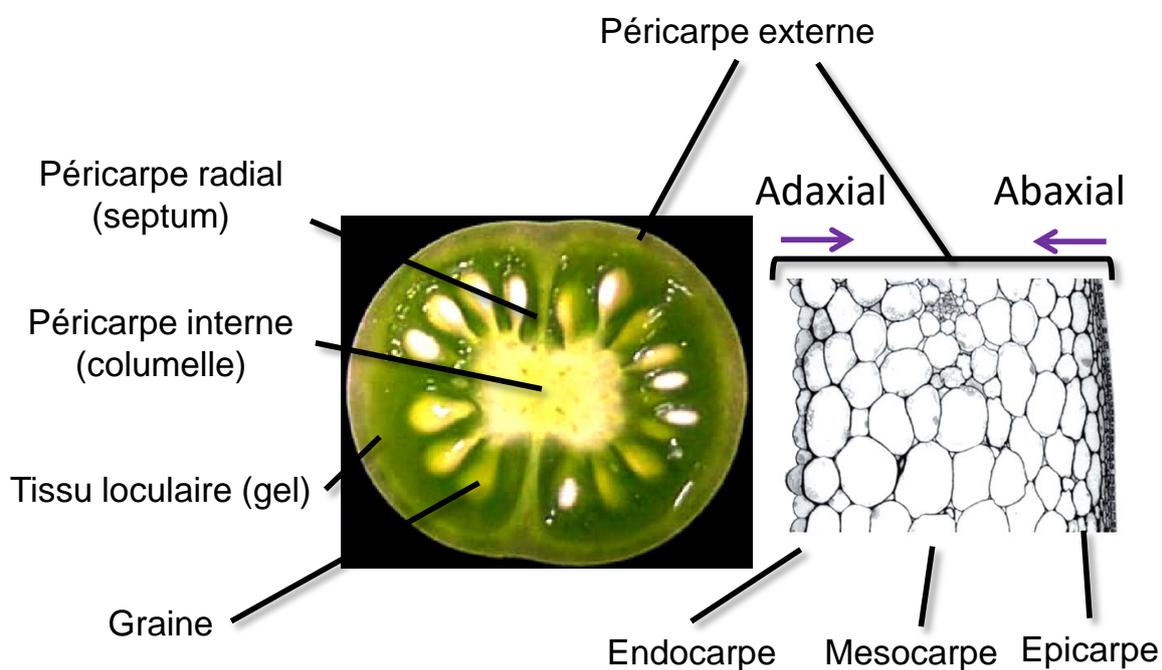


Figure 25 : Organisation anatomique du fruit de tomate au stade vert mature et détail de la structure du péricarpe. Suite à la fécondation, l'ovaire formé des deux carpelles soudés va se transformer en fruit. La paroi ovarienne va donner le péricarpe externe formé de trois parties (épicarpe, mésocarpe et endocarpe), la soudure des carpelles est à l'origine du péricarpe radial (septum) et du péricarpe interne ou columelle relié au graine par le placenta au sein des cavités loculaires contenant le gel.

sont d'un intérêt majeur. En effet, le nombre de carpelles est aussi influencé par l'allocation d'un domaine plus grand du MF au développement des carpelles. C'est le cas chez le mutant *sup* chez qui le nombre de carpelles est diminué au profit du nombre d'étamines en raison de l'implication de *SUP* dans le contrôle de la frontière entre le 3^e et le 4^e verticille. La présence d'un méristème floral élargi et d'un nombre de pétales plus important chez le double mutant *ag1 sup* en comparaison avec le mutant *ag1*, suggère une intervention en parallèle d'*AG* dans le mécanisme de terminaison florale (**Bowman et al., 1992**) (**figure 22**). On trouve aussi chez le mutant *knu* un nombre de carpelles augmenté (**Payne et al., 1994**) suggérant que la perturbation de la terminaison florale donnant lieu au maintien tardif de la prolifération des cellules souches méristématiques chez *A. thaliana* permet la mise en place de plus de carpelles.

Le développement du fruit chez S. lycopersicum

Le fruit de tomate est charnu, il s'agit d'une baie formée d'un péricarpe provenant du développement des parois carpellaires, d'un tissu loculaire interne (le gel) entourant les graines, de la columelle provenant du développement de l'axe central du fruit et du placenta.

Le péricarpe qui se développe à partir de la paroi externe des carpelles, possède une polarisation abaxiale-adaxiale (**figure 25**). Il se compose de trois tissus distincts : l'exocarpe formé de l'assise cellulaire la plus externe, l'épiderme, et de deux à quatre assises cellulaires sous-jacentes ; le mésocarpe constitué d'un nombre variable d'assises cellulaires ; et l'endocarpe formé de l'épiderme interne délimitant les loges carpellaires (**figure 25**). Les septa séparent le fruit en plusieurs loges. La columelle est composée du placenta et de nombreux vaisseaux conducteurs. Après la fécondation, la prolifération puis la différenciation des cellules du placenta donnera naissance au tissu loculaire qui va alors remplir les loges carpellaires et entourer les graines (**figure 25**).

Le développement du fruit de tomate est divisé en quatre phases (**figure 26**). La première phase correspond à la mise à fruit. Elle comprend le développement précoce de l'ovaire et la fécondation ; c'est une étape clé du développement du fruit car la transformation de l'ovaire en fruit va être dépendante de l'efficacité de la fécondation. En effet, le nombre de graines viables conditionne directement la croissance de l'organe par le biais de signaux hormonaux (**Gillaspy et al., 1993**). Après la fécondation, le développement précoce du fruit est marqué

par une activité de divisions cellulaires très intense dans l'ensemble des tissus du fruit. Dans le péricarpe externe, les cellules subissent des divisions péricleinales et anticlinales, permettant l'augmentation du nombre d'assises cellulaires et du diamètre du fruit. Au niveau du placenta, les divisions cellulaires permettent la mise en place du tissu loculaire. À la suite de cette phase de division, une seconde phase marquée par une importante expansion cellulaire débute et s'accompagne d'une augmentation considérable de la ploïdie cellulaire via un cycle cellulaire modifié : l'endoréduplication. Celui-ci est, à la différence du cycle classique, constitué de deux phases seulement, une phase S de synthèse d'ADN et une phase G. L'absence de mitose engendre une augmentation de la ploïdie cellulaire (**Joubès et Chevalier, 2000**) pouvant atteindre des niveaux très importants (jusqu'à 512C). Ce phénomène entraîne la formation d'un gradient de ploïdie dans le péricarpe positivement corrélé à la formation d'un gradient de la taille cellulaire (**Bourdon et al., 2011**). Cette augmentation de la ploïdie associée à l'augmentation de la taille des cellules est également observée dans le tissu loculaire. Cette phase d'expansion va permettre au fruit d'atteindre une taille proche de sa taille finale avant d'entrer dans la phase de maturation.

À la fin de la phase d'expansion cellulaire, le fruit est au stade Vert Mature ; il va alors passer par 5 stades de maturation : Breaker, Tournant, Orange, Rouge léger et Rouge Mûr (**figure 26**). La maturation du fruit va s'accompagner d'importants changements métaboliques se traduisant par une modification de sa composition en sucres, acides organiques et pigments (caroténoïdes et chlorophylles), par la synthèse de composés volatiles mais aussi par la dégradation de la paroi cellulaire entraînant une perte de fermeté (**Alexander et Grierson, 2002**).

Régulation génétique du développement précoce du fruit

La croissance du fruit est la résultante de l'ensemble des événements abordés précédemment, et chaque étape fait l'objet d'un contrôle génétique et hormonal très fin (**figure 26**). Les stades de division cellulaire et d'expansion cellulaire font intervenir au sein des cellules la régulation précise de la formation des complexes Cyclin-Dependent Kinase-Cyclin (CDK-Cyc) responsable de la progression du cycle cellulaire. La perturbation de certains de ces complexes résulte en une altération du développement du fruit. En effet, une perte de fonction partielle pour le gène *CDKA ;1* entraîne une diminution de la taille du fruit en lien

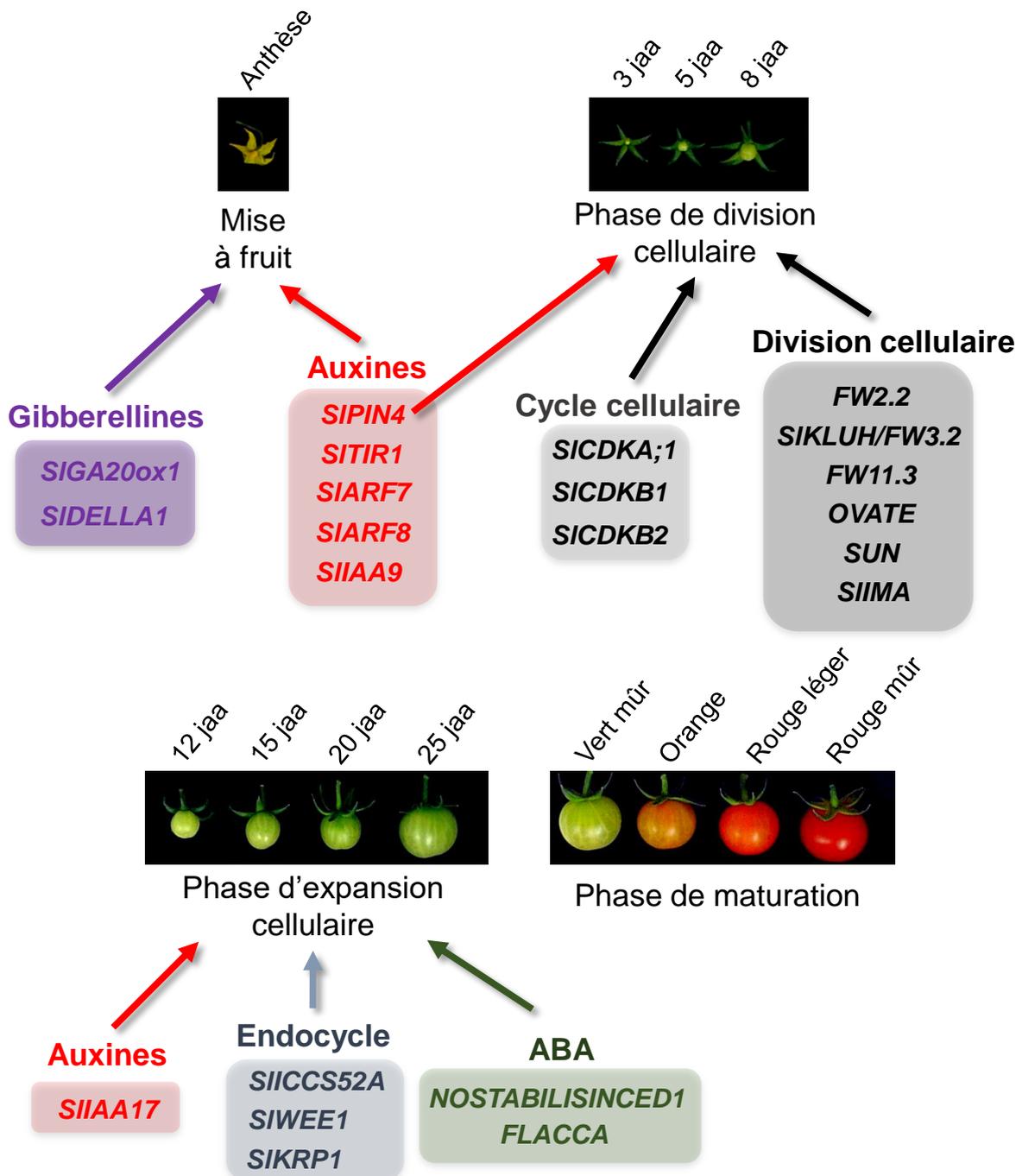


Figure 26 : Régulation génétique des différents stades de développement du fruit de tomate (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiformae*).

La découverte de QTL, le clonage des gènes qui y sont associés et leurs validations fonctionnelles ont permis d'identifier un certain nombre d'intervenants des différentes étapes du développement du fruit de Tomate (mise à fruit, phase de division cellulaire, phase d'expansion cellulaire et phase de maturation).

Les hormones (auxines, gibbéréllines et ABA) et les régulateurs du cycle cellulaire et de l'endocycle sont les acteurs majeurs de ce processus.

jaa : jours après anthèse.

avec une réduction du nombre d'assises cellulaires dans l'exocarpe (**Czerednik et al., 2012**), tandis que la surexpression de ce même gène donne lieu à des fruits de même taille que les fruits sauvages mais présentant un péricarpe plus épais résultant d'une augmentation du nombre d'assises cellulaires, un placenta plus développé mais formé de cellules de plus petite taille avec un niveau d'endoréduplication moins important en comparaison des cellules du même tissu chez la plante non transgénique. La régulation spatio-temporelle de l'expression de ces gènes étant très fine, et les régulations post-traductionnelles très importantes (phosphorylation, dégradation, action d'inhibiteurs), il est souvent difficile de tirer parti de la perturbation de leur expression afin d'influencer le développement du fruit.

Le contrôle génétique de la taille du fruit a fait l'objet de nombreuses études et a permis d'isoler près de 30 quantitative trait loci (QTL) (**Grandillo et al., 1999**) qui influencent la taille du fruit de tomate. Parmi ceux-ci, le gène *Fw2.2* joue un rôle majeur. En effet, *Fw2.2* est responsable de près de 30% de la variation de la taille du fruit. *Fw2.2* code une protéine régulant négativement la mitose et participant à la voie de régulation du cycle cellulaire mais son rôle exact reste toujours énigmatique (**Cong et al., 2006**). Le développement du péricarpe et notamment le nombre de cellules est un élément clé dans la taille du fruit. Le gène *TOMATO AGAMOUS-LIKE1 (TAGL1)* orthologue de *SHP* chez *A. thaliana*, joue un rôle important dans le contrôle de l'épaisseur du péricarpe. En effet, les fruit des lignées perte de fonction *RNAi::TAGL1* présentent une forte réduction du nombre d'assises cellulaires dans le péricarpe et une absence de péricarpe interne (**Vrebalov et al., 2009**). Parmi les gènes impliqués dans la forme du fruit, *SUN* et *OVATE* sont responsables de l'allongement du fruit. *FAS* et *LOCULE NUMBER (LC)* (qui serait associé à deux SNP situés 1200 paires de bases après le codon stop du gène *SIWUSCHEL*) (**Munos et al., 2011**) affectent le nombre de loges carpellaires et par conséquent la taille et la forme du fruit. Un autre locus nommé *EXCESSIVE NUMBER OF FLORAL ORGANS (ENO)* intervient dans le contrôle du nombre d'organes floraux et *per se* du nombre de carpelles (**Fernandez-Lozano et al., 2015**). Il est situé à l'extrémité du chromosome 3 (57.76–63.81 Mbp) et son altération dans les lignées mutantes *eno* entraîne une modification des niveaux d'expression de *SIWUS* et d'*IMA* mais pas de *FAS* suggérant une action parallèle.

Importance de la régulation hormonale dans le développement précoce du fruit

La régulation hormonale joue un rôle majeur dans le développement du fruit et ce, dès la mise à fruit. A l'image des fruits secs, le développement des fruits charnus est majoritairement régulé par les auxines, les cytokinines et les gibbérellines. La preuve irréfutable de leur intervention est que l'application exogène de ces trois hormones permet le développement normal du fruit en l'absence de fécondation (**Nitsch, 1952**).

Dès la mise à fruit, l'auxine va jouer un rôle primordial. En effet, les études effectuées sur le transporteur *SIPIN4*, montrent que la perturbation de l'efflux d'auxine entraîne une parthénocarpie et la formation de fruits de taille réduite (**Mounet et al., 2012**) (**figure 26**). Les données récentes suggèrent que les auxines interviennent dans la mise à fruit et sa croissance en partie par le biais de la régulation des GA (**Serrani et al., 2008**) confirmant une action commune de ces deux hormones. Cette situation est illustrée par le rôle du gène *SIARF7* dans la réponse au GA durant les stades précoces du développement du fruit (**De Jong et al, 2009 et De Jong et al., 2011**). En effet, la perte de fonction pour *SIARF7* entraîne l'apparition de fruits parthénocarpiques présentant des altérations phénotypiques associées à une augmentation de la réponse aux auxines et aux GA. De la même manière, l'altération de l'expression des DELLA induit la formation de fruits parthénocarpiques. Un travail récent rapporte qu'en plus des GA, les CK sont aussi impliquées dans la parthénocarpie chez la tomate (**Ding et al., 2013**) suggérant que les trois hormones, auxines, CK et GA sont fortement interconnectées. Il est intéressant de noter que ces hormones jouent un rôle équivalent dans les fruits secs et charnus. L'éthylène joue aussi un rôle important dans la mise à fruit. L'éthylène serait produit dans les ovules et interviendrait par inhibition de la réponse au GA, notamment au travers de l'action de *CTR1* stabilisant les DELLA (**Carbonell-Bejerano et al., 2011**). En tant que principales hormones impliquées dans la régulation de la division et de l'expansion cellulaire, les auxines et les cytokinines sont d'importantes voies de régulation de la croissance du fruit. Ainsi, la forte synthèse d'auxines et de CK dans les graines en développement est nécessaire au bon développement du fruit (**Crane, 1964**). Les auxines interviennent notamment via la régulation du processus d'endoréplication. En effet, les plantes perte de fonction pour le gène *SIIAA17* produisent

Autre nom	Nom	ZHD1	ZHD2	ZHD3	ZHD4	ZHD5	ZHD6	ZHD7	ZHD8	ZHD9	ZHD10	ZHD11	ZHD12	ZHD13	ZHD14	MIF1	MIF2	MIF3
AtHB21	ZHD1	0	3	2	3	3	4	3	3	1	4	3	0	1	1	2	2	0
AtHB27	ZHD2	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0	0	1	0	0
AtHB28	ZHD3	3	3	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	3	3
AtHB29	ZHD4	1	3	1	1	2	1	2	1	0	1	3	0	0	0	0	0	0
AtHB30	ZHD5	4	4	1	3	1	0	2	2	0	4	4	0	0	0	3	3	3
AtHB31	ZHD6	1	3	0	1	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0	2	1	2
AtHB32	ZHD7	4	4	0	1	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	3	1	3
AtHB33	ZHD8	4	3	0	1	1	1	1	1	0	2	3	0	0	0	3	3	3
AtHB34	ZHD9	0	4	0	1	2	1	1	1	0	2	3	0	0	0	0	0	3
AtHB22	ZHD10	4	4	2	3	3	3	2	2	1	2	1	0	0	0	2	3	3
AtHB23	ZHD11	3	3	3	4	4	4	3	3	3	4	2	3	3	3	0	0	0
AtHB24	ZHD12	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AtHB25	ZHD13	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	3	3	3
AtHB26	ZHD14	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

Figure 27 : Tableau d'interactions en double hybride chez la levure entre les différentes protéines ZHD et les protéines MIF (d'après Hu et Ma, 2006 et Hong *et al.* 2011).

L'intensité de l'interaction est représentée selon le code suivant : 4 : très forte ; 3 : forte ; 2 : modérée ; 1 = faible ; 0 : pas d'interaction. En colonne fusion avec AD, en ligne fusion avec BD.

des fruits avec un péricarpe plus épais dont les cellules présentent une augmentation du niveau de ploïdie (**Su et al., 2014**).

Conclusion

Ainsi, le développement du fruit est un processus finement régulé faisant intervenir un réseau génétique et hormonal complexe. Il semblerait que chez les deux espèces modèles, *A. thaliana* et la Tomate, le nombre de valves/loges soit directement lié aux étapes précoces du développement du fruit et en particulier, à la régulation de la maintenance des cellules souches méristématiques. La compréhension du réseau génétique impliqué dans le développement floral est donc un prérequis nécessaire à l'élucidation des voies contrôlant le développement du fruit. Dans cet objectif, de nombreux laboratoires se sont intéressés à l'isolement de nouvelles familles de gènes impliquées dans le développement floral. Parmi celles-ci, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la famille des ZHD (*Zinc finger HomeoDomain*) récemment découverte.

La famille des Zinc finger Homeodomain (ZHD)

Découverte des ZHD

Les protéines de la famille ZHD ont été découvertes chez la plante C4 *Flaveria trinervia*, plante à fleur de la famille des Astéracées (**Windhövel et al., 2001**). Quatre protéines ZHD ont été identifiées chez cette espèce. Elles sont capables de se lier à l'ADN au niveau du promoteur du gène de la phosphoenol pyruvate carboxylase 4 (PEPC4). L'étude de ces quatre protéines a permis de révéler la présence de deux domaines, un domaine doigt à zinc non canonique situé en C-terminal, soupçonné d'être impliqué dans des interactions protéine-protéine et permettant l'homo- et l'hétéro-dimérisation de ces protéines et un homéodomaine situé en N-terminal nécessaire à la liaison à l'ADN.

Les ZHD se distinguent par des variations jamais répertoriées auparavant dans la séquence de l'homéodomaine leur conférant une spécificité de liaison à l'ADN au niveau de séquences consensus de vingt nucléotides contenant le motif « ATTA » (**Tan et Irish, 2006 et Park et al., 2007**). Il est intéressant de noter que la majorité des protéines ZHD ne contient pas de

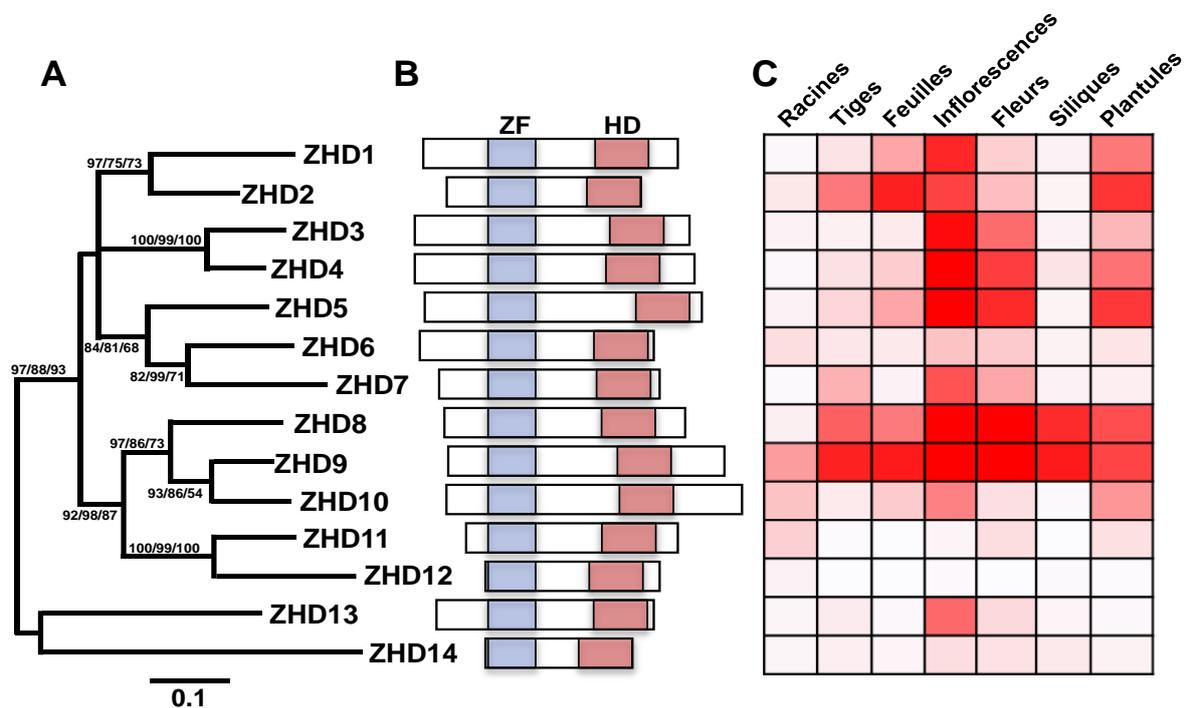


Figure 28 : Arbre phylogénétique, structure protéique et territoires d'expression des différents gènes ZHD d'*A. thaliana* (d'après Hu et al., 2008).

(A) Arbre phylogénétique des différents gènes ZHD identifiés au sein du génome d'*A. thaliana* selon la méthode neighbor-joining.

(B) Représentation schématique des longueurs de protéines et des positions respectives des domaines doigt à zinc (ZF) et des homéodomaines (HD).

(C) Territoires d'expression des différents gènes appartenant à la famille ZHD.

domaine d'activation de la transcription suggérant que ces protéines nécessitent l'association avec d'autres facteurs pour jouer leur rôle de régulateur transcriptionnel **(Hu et Ma, 2006)**.

Le domaine doigt à zinc présente une structure particulière aux membres de la famille ZHD. Ce motif contient cinq cystéines et trois histidines très conservées, qui sont organisées selon le motif suivant CX₃HX₁₁CX₁₂₋₂₆CX₂CXCHX₃H. Ce domaine est nécessaire et suffisant à l'interaction physique des ZHD et les cystéines jouent un rôle important dans cette activité ; en effet, la mutation de ces cystéines entraîne une perte d'interaction physique entre les protéines ZHD **(Tan et Irish, 2006)**. Les analyses d'interaction par double-hybride chez la levure révèlent que de nombreuses interactions sont possibles entre les différents membres de la famille ZHD **(figure 27)**.

Phylogénie des ZHD : une famille spécifique du règne végétal

L'analyse phylogénétique de la famille ZHD a permis de révéler que les ZHD forment un groupe monophylétique distinct des autres classes de gènes codant des protéines à homéodomaine **(Hu, de Pamphilis et Ma, 2008)**. Ils sont spécifiques des plantes, apparus avec les plantes terrestres et leurs séquences ne présentent pas d'introns. De multiples duplications génétiques sont intervenues avant la séparation des taxons composant les Angiospermes. Les analyses phylogénétiques ont aussi permis de mettre en évidence l'existence de 7 clades majeurs **(figure 28) (Hu, de Pamphilis et Ma, 2008)**. Le clade I est le plus basal et comprend les ZHD de plantes sans graines comme *Physcomitrella* ou *Selaginella*. Les clades II et III comprennent des ZHD fortement conservés au cours de l'évolution chez les angiospermes. Dans le clade IV, les ZHD des monocotylédones et dicotylédones évoluent séparément en deux clades différents. Ce clade n'inclue aucun gène ZHD provenant des plantes basales indiquant une émergence tardive. Le clade V est fortement divergent des autres clades et prédominant chez les eudicotylédones et le clade VI est le plus divergent au sein des angiospermes. Le clade VII comprend des séquences éloignées et qu'il n'a pas été possible de rapprocher des autres. Très récemment, les travaux effectués par **Wang et al. (2015)** référençaient le nombre de gènes ZHD chez une vingtaine de plantes supérieures à l'aide notamment des annotations des nombreux génomes désormais disponibles.

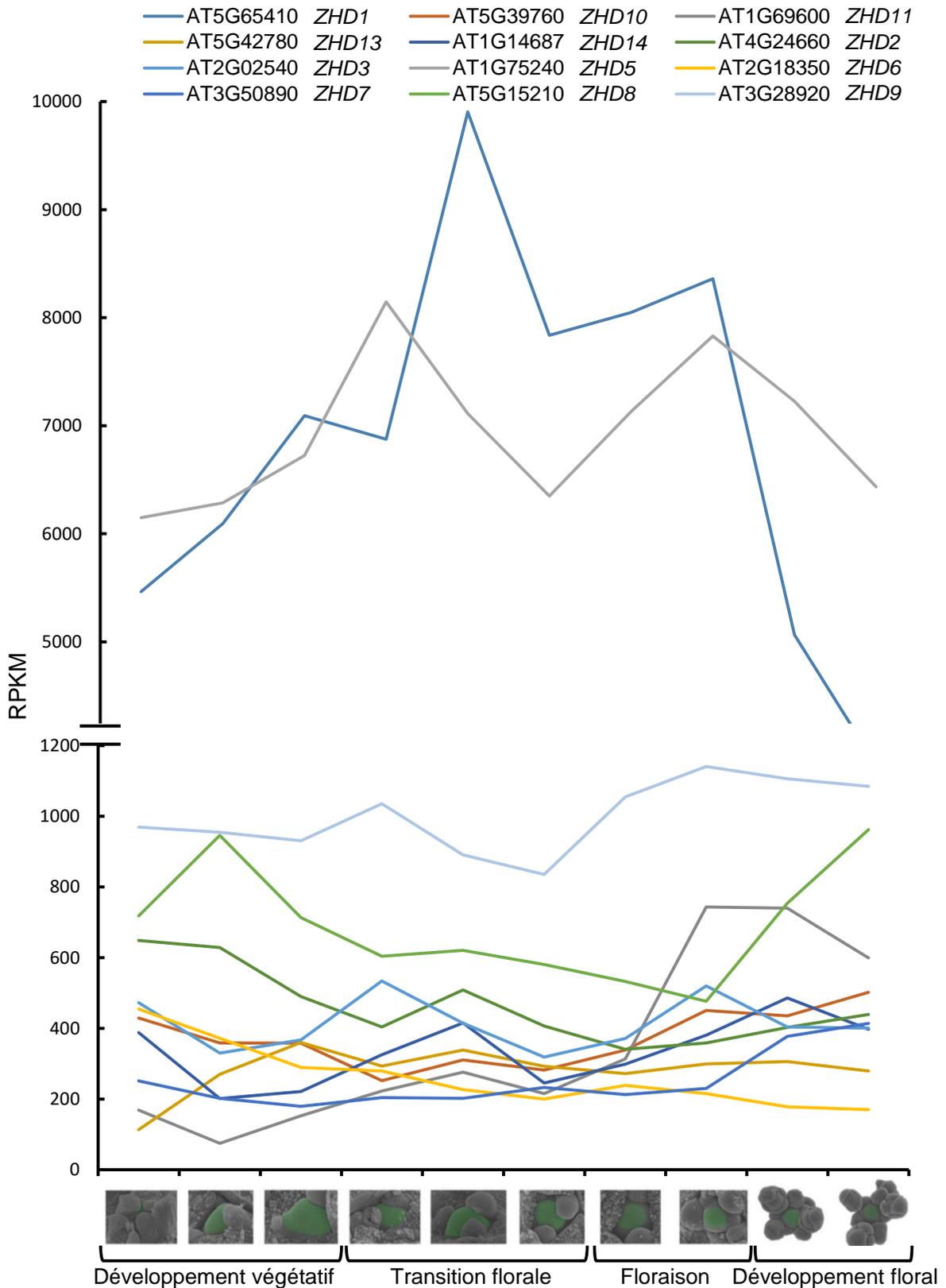


Figure 29 : Profils d'expression des gènes ZHD au cours de la transition florale chez *A. thaliana*.

Les données d'expression RNA-seq sont issues de Klepikova *et al.*, 2015.

Territoires d'expression des *ZHD*

Chez *A. thaliana*, l'ensemble des membres de cette famille possède une expression florale majoritaire indiquant un rôle potentiel dans le développement de la fleur (**Tan et Irish 2006**) (**figure 27**). Les gènes *ZHD5* et *ZHD7* possèdent une expression strictement florale ; *ZHD1*, *ZHD3*, *ZHD4* et *ZHD13* s'expriment en majorité dans l'inflorescence et la fleur jeune, tandis que les gènes *ZHD2* et *ZHD11* sont plutôt exprimés dans la fleur âgée. Les gènes *ZHD8* et *ZHD9* possèdent quant à eux une expression large dans l'ensemble des tissus de la plante. Il est intéressant de noter que l'expression du gène *ZHD12* n'a pas pu être détectée chez *A. thaliana* suggérant l'hypothèse que *ZHD12* soit un pseudogène (**figure 28 et 29**).

Au sein de récents travaux, une analyse transcriptomique a été effectuée chez *A. thaliana* à différents stades durant la transition entre le meristème végétatif et floral (**Klepikova et al., 2015**). Ces données sont d'un intérêt tout particulier concernant les gènes de la famille *ZHD*. En effet, on observe que bien que deux des membres de la famille *ZHD* (*ZHD1* et *ZHD5*) soient exprimés à des niveaux beaucoup plus élevés que les autres membres dans ces tissus (près de dix fois plus), l'ensemble des *ZHD* sont exprimés durant cette période (**figure 29**). De plus, le fort pic d'expression de *ZHD1* lors de la transition florale ou l'augmentation du niveau d'expression de *ZHD11* lors du début du développement floral pourrait être lié à une fonction particulière de ces gènes lors de ces stades précis.

Le fait qu'aucun phénotype n'ait pu être observé chez six simples mutants semble indiquer une redondance fonctionnelle entre les différents gènes de la famille *ZHD*. Il est intéressant de noter que *ZHD11* est un des rares *ZHD* à posséder un domaine d'activation de la transcription ainsi il pourrait réguler directement l'expression de gènes cibles.

Les études d'expression effectuées chez les autres espèces confirment les résultats observés chez *A. thaliana*. En effet, ils révèlent non seulement des territoires d'expression très variés mais aussi des réponses très différentes des gènes *ZHD* consécutives à l'exposition des plantes à des stress divers (salins, hydriques, etc.) (**Wang et al., 2016**).

Les *ZHD* chez la Tomate

Encore aujourd'hui, très peu d'informations sont disponibles concernant les gènes de la famille *ZHD* chez la Tomate. Les analyses phylogénétiques effectuées par **Hu et al., (2008)**

ont permis de mettre en évidence l'existence d'au moins deux gènes ZHD chez la tomate, originellement nommés *LesZHD1* proche d'*AtZHD2* et *LesZHD2* proche d'*AtZHD6* et *AtZHD7*. Plus récemment, les analyses phylogénétiques effectuées tendent à indiquer une plus grande proximité entre *LesZHD2* et *AtZHD5*. De plus, grâce aux nouvelles annotations du génome de la tomate, vingt-deux gènes ZHD ont pu être identifiés (**Wang et al., 2015**).

Le large territoire d'expression dont fait preuve la majorité des gènes de la famille ZHD traduit certainement une intervention dans de nombreux processus. Cependant, la redondance fonctionnelle des gènes de la famille, leur grand nombre et les effets pléiotropes de leur surexpression rendent difficile l'identification de leurs fonctions. Les travaux effectués sur les gènes de la famille ZHD ont été réalisés sur de nombreuses espèces et apportent peu à peu des éléments de compréhension quant à leurs fonctions respectives.

Rôles des ZHD : réponses aux stress et développement

Les gènes de la famille ZHD sont notamment impliqués dans la réponse aux stress biotiques. En effet, des travaux effectués chez le soja (*Glycine max*) ont permis de montrer la capacité d'interaction de protéines ZHD avec les séquences cibles « ATTA » présentes dans la séquence promotrice du gène codant l'isoforme 4 de la calmoduline en réponse à l'infection par un pathogène (**Park et al., 2007**).

D'autres travaux ont permis de montrer que les gènes de la famille ZHD étaient impliqués dans la réponse aux stress abiotiques. En effet, il a pu être montré que les expressions de certains ZHD étaient influencées par le stress hydrique impliquant également la voie de l'ABA. Chez *A. thaliana*, les plantes surexprimant le gène *AtZHD11* montrent une tolérance accrue à la sécheresse (**Tran et al., 2007**). Cela semble lié au fait que l'expression de *ZHD11* est induite par le stress hydrique et l'ABA puis la protéine ZHD11 est capable de se fixer au promoteur du gène *ERD1* (*EARLY RESPONSE TO DEHYDRATION STRESS 1*) de manière conjointe avec une protéine de la famille NAC afin d'induire l'expression de *ERD1* en réponse au stress (**Tran et al., 2007**). A l'inverse, en réponse à l'ABA le facteur de transcription ARF2 va inhiber la transcription du gène *AtZHD5* ce qui aura pour conséquence de limiter les processus de germination et de croissance racinaire (**Wang et al., 2011**). D'autres travaux, effectués sur le blé, ont permis de montrer que l'expression de *TaZFHD1*, gène proche d'*AtZHD9* est régulée

par le methyl jasmonate (MeJA), l'ABA et l'éthylène suggérant un rôle de ce gène dans la réponse au stress (**Abu-Romman, 2013**).

En plus de cette implication dans la réponse au stress, leur implication dans de nombreux processus développementaux et de réponse aux hormones a pu être mise en évidence. Ainsi, il a été montré que la surexpression d'*AtZHD5* entraîne une augmentation de la taille des plantes et de l'ensemble des organes corrélée à une augmentation de la taille cellulaire (**Hong et al., 2011**). A l'inverse, chez le riz, la surexpression d'*OsZHD1* entraîne un nanisme résultant d'une réduction du nombre de cellules tandis que leurs tailles restent inchangées. De plus, il est observé une courbure anormale de la feuille provenant d'une altération de l'organisation tissulaire (**Xu et al., 2014**). Ces éléments vont dans le sens d'une intervention des ZHD dans des processus développementaux importants et conservés. Bien que certains des ZHD étudiés possèdent une forte expression florale, les effets phénotypiques de leurs surexpressions ou de leurs pertes de fonctions sur le développement floral n'ont pas été rapportés jusqu'à maintenant.

Ce n'est que très récemment que deux publications ont décrit des phénotypes permettant d'établir un lien entre les ZHD, les GA et la longévité des graines (**Bueso et al., 2014 ; Bueso et al., 2016**). Les auteurs de cette étude se sont intéressés aux phénotypes des graines des plantes gain- et perte-de-fonction pour *AtZHD1*. En effet, ces plantes présentent respectivement des graines plus grandes et plus petites. Ces modifications de tailles sont liées à une altération de l'épaisseur du mucilage. En raison de la similarité de ce phénotype avec les mutants de la voie des GA et la réponse altérée de ces plantes aux GA, ils se sont plus particulièrement intéressés au lien entre *AtZHD1* et les GA. Ils ont démontré que les lignées gain-de-fonction accumulent plus de GA4 et GA1 que les plantes de type sauvage. Cette accumulation des GA4 et GA1 est le résultat d'une augmentation du niveau d'expression des gènes *GA3OX2*, *GA20OX1* et *GA20OX3* tandis que les gènes *GA20OX4* et *GA20OX5* sont moins exprimés (**Bueso et al., 2014**).

Ainsi, il semblerait que les ZHD occupent des fonctions variées tant dans les développements végétatif et de la graine que dans de nombreuses voies de réponses au stress chez les plantes. Ces implications dans des processus variés seraient principalement liées à l'intervention des ZHD dans la réponse aux signaux hormonaux.



Figure 30 : Profils d'expression des gènes *MIF* chez *A. thaliana* (d'après Hu et Ma, 2006).

Les gènes *MIF1* et *MIF3* présentent des profils d'expression proches et très larges tandis que *MIF2* se distingue par une expression florale majoritaire et une totale absence dans les tissus végétatifs (racines et feuilles).

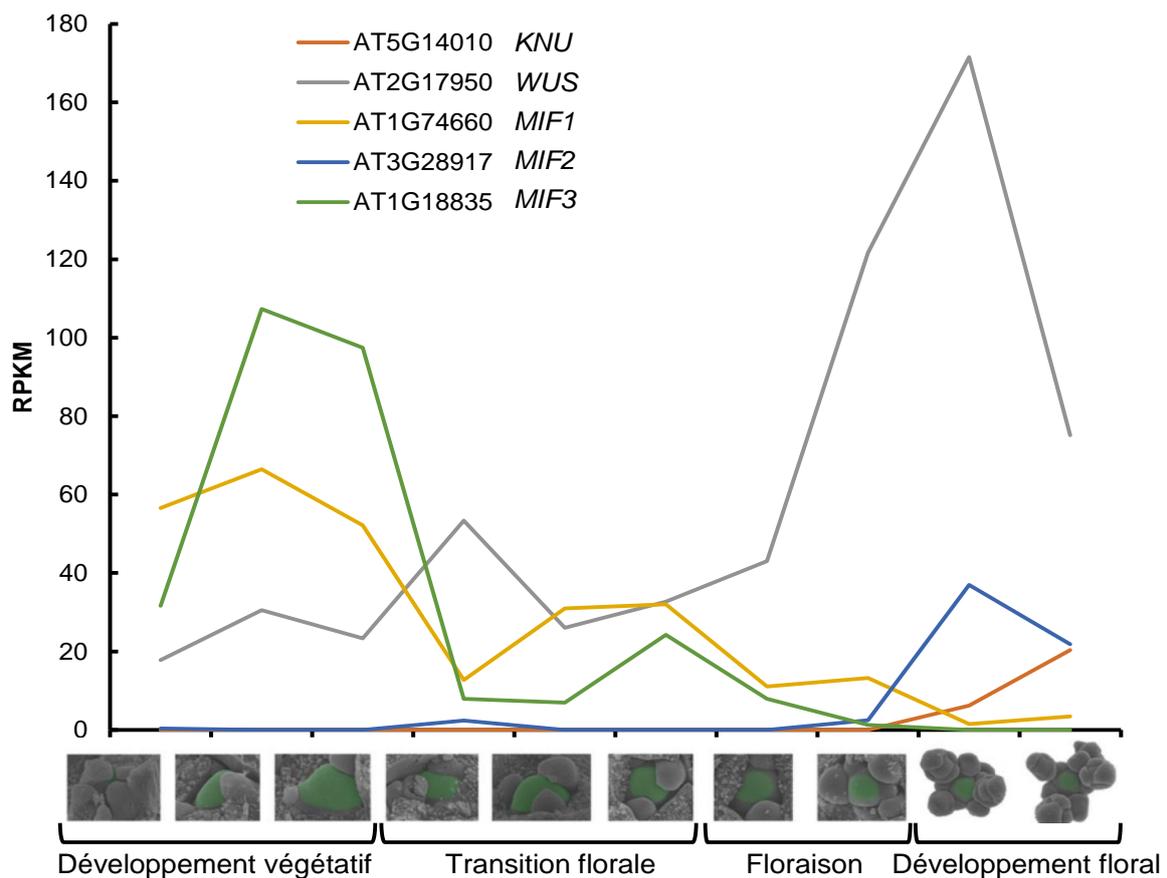


Figure 31 : Profils d'expression des gènes *MIF1*, *MIF2* et *MIF3*, *KNU*, et *WUS* au cours de la transition florale chez *A. thaliana*.

Les données d'expression RNA-seq sont issues de Klepikova *et al.*, 2015.

Les gènes *Mini zinc Finger* (MIF)

En 2006, une sous-famille de protéines apparentées aux ZHD a été décrite par **Hu et Ma (2006)**. Il s'agit des protéines MIF (Mini Zinc Finger). Leur particularité est de ne posséder que le domaine doigt à zinc retrouvé chez les ZHD. Les MIF sont présents uniquement chez les plantes à graine et semblent être apparus suite à la perte de l'homéodomaine chez un ancêtre commun. Au cours de l'évolution des Gymnospermes et des Angiospermes, les gènes *MIF* ont subi des duplications. Ainsi, les protéines MIF des Gymnospermes forment un groupe monophylétique distinct du groupe des Angiospermes suggérant une duplication ayant eu lieu postérieurement à la séparation des Gymnospermes et des Angiospermes (**Hu et Ma, 2008**).

Fonction des MIF chez A. thaliana

L'analyse du génome d'*A. thaliana* a révélé l'existence de trois gènes *MIF1*, *MIF2* et *MIF3*. Les gènes *MIF1* et *MIF3* présentent une très forte homologie suggérant une duplication récente et des territoires d'expression similaires et relativement étendus dans tous les organes de la plante tandis que *MIF2* se distingue tant en termes de séquence protéique que par son expression assez restreinte à la tige, la fleur et la silique (**Hu et Ma, 2006**) (**figure 30**). Ces protéines sont de très petite taille, environ 100 acides aminés, et ne semblent comporter que le domaine doigt à zinc. Les données acquises lors du RNAseq effectué par **Klepikova et al.** en 2015 confirment ces résultats et nous permettent de corréler ces expressions avec d'autres gènes (**figure 31**). On observe que les gènes *MIF1* et *MIF3* voient leur niveau d'expression décroître lors de la transition florale à l'inverse de l'expression de *MIF2* qui débute avec l'apparition de l'inflorescence. Il est intéressant de voir que l'expression de *MIF2* débute en même temps celle de *KNU*, lorsque celle d'*AG* augmente et qu'elle décroît en même temps que celle de *WUS*.

Les gènes *MIF1* et *MIF3*

La découverte et l'étude de *MIF1* a débuté avec les travaux de Hu et Ma (2006) qui l'ont décrit comme un médiateur de la régulation de plusieurs voies de signalisation hormonale dans le contrôle du développement de la plante (**Hu et Ma, 2006**). Aucun mutant perte-de-fonction *MIF* n'a pu être obtenu à ce jour suggérant que les mutations dans ces gènes sont létales ou tout du moins, empêchent la germination des graines. Cependant, la réduction du

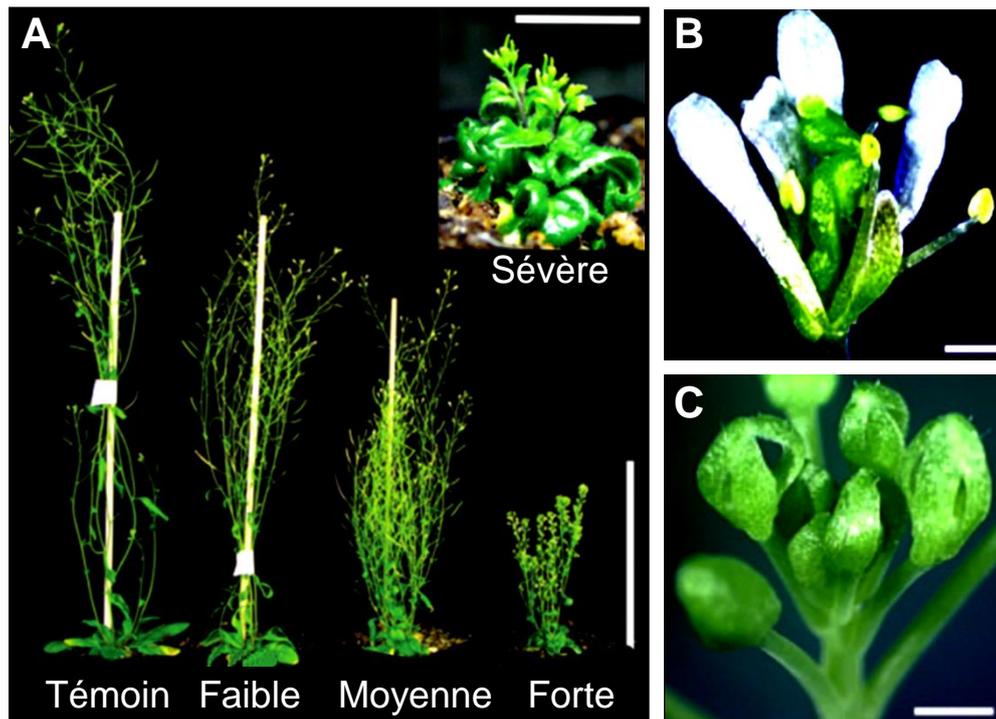


Figure 32 : Phénotypes végétatifs et floraux des lignées 35S::MIF1 (d'après Hu et Ma, 2006).

(A) Phénotypes végétatifs de plantes 35S::MIF1 de 8 semaines, surexprimant plus ou moins intensément le gène *MIF1* (faible, moyenne, forte, sévère) comparée à une lignée transformée par un vecteur vide (Témoin).

Les plantes 35S::MIF1 présentent un phénotype nain et buissonnant dont la sévérité dépend du niveau de surexpression de *MIF1*.

(B) Phénotype floral des plantes 35S::MIF1

(C) Phénotype inflorescentiel de plantes 35S::MIF1

Ces plantes présentent une altération importante du développement floral, les sépales sont souvent fusionnés et la réduction de la taille des sépales et des pétales résulte en un pistil courbé.

Echelle : (A) et (B) : 0.5mm ; (C) : 10cm

niveau des transcrits de *MIF1* par RNAi a pu être réalisée (Hu et Ma, 2006). Malgré une réduction de l'expression de *MIF1* d'un facteur 3 ou 4 chez les plantes soumises au RNAi, les observations révèlent que celle-ci n'a pas d'effet phénotypique visible. Ces résultats suggèrent deux hypothèses : (i) *MIF1* est indispensable au développement de la plante ce qui explique qu'aucune plante sous-exprimant *MIF1* très fortement n'ait pu être obtenue, (ii) la perte de *MIF1* est en partie complétée par *MIF2* et *MIF3*.

A l'inverse, la surexpression de *MIF1* dans les plantes engendre de très nombreux phénotypes tant au niveau végétatif que reproducteur (figure 32). Ces plantes présentent une perte de dominance apicale se traduisant par un phénotype buissonnant associé à un nanisme prononcé (figure 32A). Les feuilles de la rosette sont plus foncées et présentent une épinastie importante. La croissance racinaire est réduite. La floraison chez ces plantes est retardée de plusieurs jours voire plusieurs mois en fonction des lignées. Au niveau floral, les auteurs notent une diminution de la fertilité et un développement floral altéré. Les fleurs sont plus petites que celles des plantes de type sauvage. Cette diminution de taille correspond à une diminution de la taille des sépales, des pétales et des étamines tandis que le carpelle semble se développer normalement. Des fusions peuvent apparaître entre les sépales empêchant l'ouverture de la fleur et entraînant une courbure du gynécée dans les stades tardifs de son développement (figure 32B et C). De manière globale, la surexpression de *MIF1* entraîne un ralentissement de la croissance des plantes qui résulte d'un ralentissement des divisions et de l'expansion cellulaires. De plus, les plantules présentent une forte réduction de la taille de l'hypocotyle, une absence de skotomorphogenèse et une perturbation de la réponse aux hormones. Elles sont insensibles aux auxines, répondent moins aux gibbérellines et aux cytokinines et, inversement, sont hypersensibles à l'acide abscissique. Les analyses transcriptomiques effectuées par Hu et Ma (2006) ont permis de montrer que ces altérations de réponse aux hormones sont associées à des altérations d'expression des gènes de réponse à ces mêmes hormones (Hu et Ma, 2006).

Une nouvelle étude effectuée en 2011 a permis de montrer que les surexpressions des deux autres gènes *MIF2* et *MIF3* entraînent des phénotypes pléiotropes similaires (Hu et Ma, 2011) (figure 33). On note cependant que la surexpression du gène *MIF2* entraîne des défauts phénotypiques plus modérés que la surexpression du gène *MIF1* ou *MIF3* (figure 33). Cette

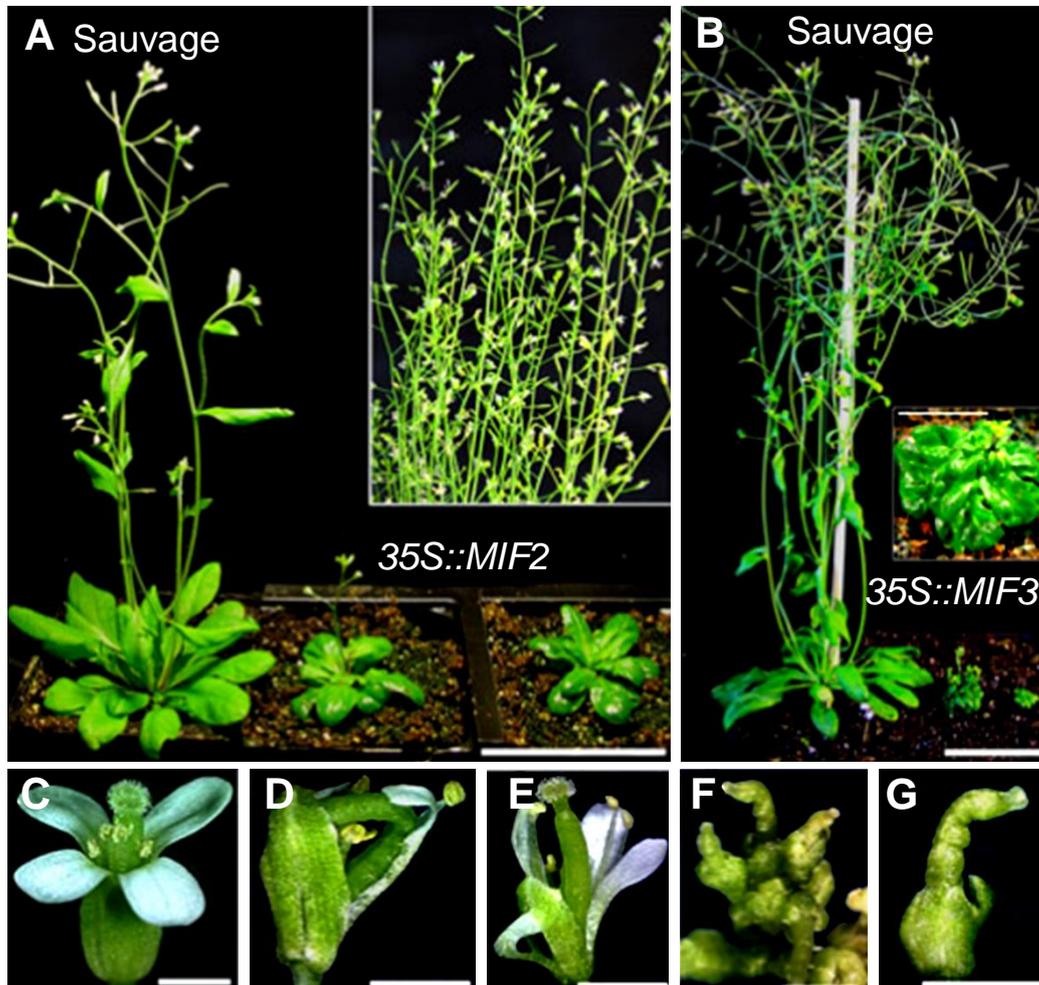


Figure 33 : Phénotypes végétatifs et floraux de plantes sur-exprimant *MIF2* et *MIF3* (d'après Hu et Ma, 2011).

(A) et (B) : Phénotype des plantes *35S::MIF2* (A) et *35S::MIF3* (B).

Ces plantes présentent tout comme les lignées *35S::MIF1* un phénotype nain et buissonnant mais la sévérité des phénotypes, quelle que soit la lignée considérée, reste moins importante que dans le cas des plantes *35S::MIF1*.

(C) Fleur de plante sauvage Col-0.

(D) et (E) phénotype des fleurs de plante *35S::MIF2*.

On observe chez ces plantes une forte altération du développement floral, les sépales sont souvent fusionnés et la réduction de la taille des sépales et des pétales entraîne la courbure du pistil.

(F) Phénotype inflorescentiel sévère des plantes *35S::MIF3*.

(G) Phénotype floral sévère des plantes *35S::MIF3*.

Dans les cas les plus extrêmes, les fleurs des plantes *35S::MIF3* présentent de très fortes altérations marquées par une absence de pétales et d'étamines et une déformation du pistil.

situation peut être expliquée par une différence de la fonction de *MIF2* par rapport à celles des gènes *MIF1* et *MIF3*. Il est intéressant de noter qu'au cours de cette étude, la surexpression de *MIF1/MIF3* a permis d'induire la production de méristèmes ectopiques sur les feuilles de rosette et ce, de manière dépendante d'*ERECTA* (ER) puisqu'aucun méristème ectopique n'est obtenu dans l'accession *Landsberg* portant la mutation perte-de-fonction *erecta* (Hu et Ma, 2011).

Cette information est intéressante car la voie *ERECTA* LRR-RK entre en jeu en parallèle du contrôle passant par la protéine *CLV1* pour réguler l'expression de *WUS* (Shpak et al., 2013) (figure 22). Bien que les récepteurs d'ER soient encore inconnus, il a été suggéré que la protéine ER intervienne, associée aux protéines hétérotrimériques G (Llorente et al., 2005). Ces dernières sont connues pour leur implication dans le contrôle de la prolifération des cellules souches méristématiques (Ishida et al., 2014).

Jusqu'à présent, le seul domaine protéique identifié dans les séquences des protéines MIF étant un domaine doigt à zinc, la capacité d'interaction des protéines MIF avec les protéines de la famille ZHD a été étudiée. Il a ainsi été mis en évidence non seulement que de nombreuses interactions étaient possibles mais surtout qu'il existait une spécificité d'interaction entre les protéines MIF et les protéines ZHD (figure 27) (Hong et al., 2011). Ainsi, le rôle des protéines MIF dans le développement de la plante pourrait être lié à leur interaction avec les protéines ZHD. Comme abordé précédemment, la surexpression de *ZHD5* entraîne une augmentation de la taille des feuilles et une croissance accélérée, un phénotype opposé à celui obtenu lors de la surexpression des *MIF* (Hong et al., 2011). Cependant, les expressions respectives des deux gènes *MIF1* et *ZHD5* ne sont pas modifiées dans les plantes transgéniques sur-exprimant l'un ou l'autre des deux gènes, excluant la possibilité d'une régulation transcriptionnelle entre ces deux gènes. Tan et Irish, (2006) et Hong et al., (2011) ont montré que *ZHD5* est capable non seulement d'interagir avec les trois protéines MIF mais aussi avec plusieurs protéines ZHD dont elle-même. Cette interaction requiert la présence du domaine doigt à zinc et conduit à l'inhibition de l'activité de la protéine *ZHD5* par deux mécanismes complémentaires. En effet, par cette interaction, la protéine *MIF1* empêche la fixation de la protéine *ZHD5* au niveau de la séquence consensus « ATTA » et réduit fortement son activité transcriptionnelle, certainement en l'empêchant de s'homo- ou hétéro-dimériser

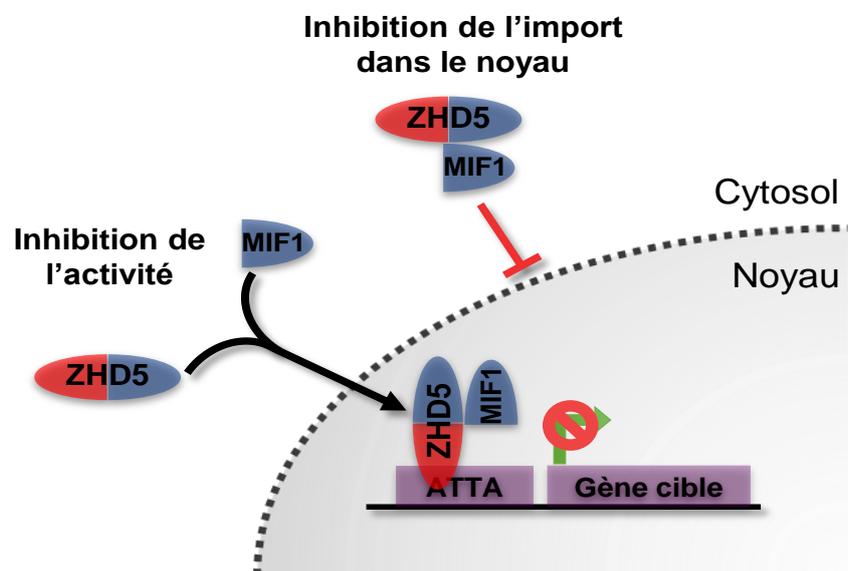


Figure 34 : Modèle schématique de la répression de ZHD5 par MIF1 : un système de type peptide interférent (d'après Hong *et al.*, 2011).

La protéine MIF1 interagit via son domaine à zinc finger avec la protéine ZHD5 et inhibe son activité par deux mécanismes distincts :

- (i) Il exclue la protéine ZHD5 du noyau, l'empêchant ainsi d'aller se fixer sur les boîtes « ATTA » des promoteurs des gènes cibles.
- (ii) Il forme un hétérodimère inactif avec la protéine ZHD5 l'empêchant ainsi d'activer la transcription de ses gènes cibles.

avec d'autres protéines. De plus, la protéine MIF1 séquestre la protéine ZHD5 en dehors du noyau l'empêchant de jouer son rôle de facteur de transcription (**Hong et al., 2011**) (**figure 34**).

Ainsi, l'activité de régulation du développement des protéines MIF semble être en partie liée à leur capacité d'interaction avec les protéines ZHD. Cependant, l'absence chez *A. thaliana* de plantes présentant une perte de fonction pour aucun des différents gènes MIF n'a pas permis d'élucider leur fonction physiologique.

Cette limitation a été partiellement levée lorsque les travaux réalisés par Sicard et al. (2008) ont permis l'identification chez la tomate d'un gène homologue du gène *MIF2* d'*A. thaliana*, le gène *INHIBITOR of MERISTEM ACTIVITY* (*IMA*). Ces travaux ont notamment permis d'impliquer le gène *IMA* dans la régulation du développement floral (**Sicard et al., 2008**).

Le gène *IMA* (*INHIBITOR of MERISTEM ACTIVITY*)

Le gène *IMA* a été isolé à partir d'une banque d'ADNc de fruits de tomate à un stade précoce (phase de division 3 à 6 jours après anthèse) en utilisant comme critère le fait que ce gène est très fortement exprimé dans cet organe et à cette phase du développement (**Sicard et al., 2008**). Les analyses de séquences effectuées sur *IMA* ont permis de montrer qu'il possède 62% d'homologie nucléotidique avec son homologue le plus proche chez *A. thaliana*, le gène *MIF2*. Ainsi, la protéine *IMA* appartient à la famille des *MIF* décrite chez *A. thaliana* par Hu et Ma (2006).

Comme c'est le cas pour le gène *MIF2* d'*A. thaliana*, aucun mutant perte-de-fonction pour le gène *IMA* n'avait été caractérisé chez la Tomate limitant ainsi l'étude de la fonction du gène *IMA*. Pour accéder à cette information essentielle, la fonction du gène *IMA* a été étudiée en caractérisant les phénotypes obtenus chez des plantes gain-de-fonction présentant une expression ectopique forte contrôlée par le promoteur CaMV 35S et des plantes perte-de-fonction créées en utilisant des stratégies d'antisens et RNAi mais aussi une construction dite «chimérique» que nous détaillerons par la suite .

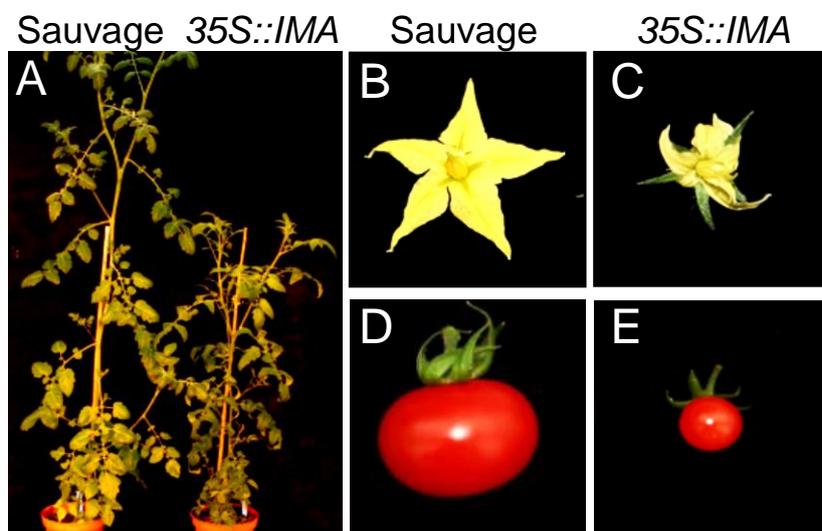


Figure 35 : Phénotype végétatif, floral et au niveau du fruit des plantes *35S::IMA* (d'après Sicard, 2008).

(A) Phénotype végétatif des plantes *35S::IMA*

Les plantes *35S::IMA* présentent un phénotype nain et buissonnant lié à une perte de dominance apicale.

(B-C) Phénotype floraux des plantes *35S::IMA*

Les organes floraux des fleurs issues de ces lignées sont plus petits et déformés.

(D-E) Phénotypes des fruits des plantes *35S::IMA*

La réduction de la taille des carpelles des fleurs des plantes *35S::IMA* entraîne la formation de fruits de plus petites tailles.

Effets phénotypiques de la dérégulation du gène IMA

A l'image des plantes surexprimant *MIF2* chez *A. thaliana* (Hu et Ma, 2006), les plantes sur-exprimant *IMA* sont plus petites et plus ramifiées que les plantes de type sauvage, indiquant une perte de la dominance apicale et une altération de la croissance végétative (figure 35A) (Sicard et al., 2008). Leur croissance est ralentie, on observe un délai de trois à quatre jours dans l'émergence des cotylédons et seules deux à trois feuilles sont formées après un mois de culture contre cinq à six feuilles pour des plantes de type sauvage. Cette altération est corrélée avec une forte réduction de l'activité méristématique. La forme et la couleur des feuilles sont aussi affectées : les feuilles sont anormalement courbées avec une augmentation de l'épinastie et sont plus foncées que celles des plantes de type sauvage. De plus, les fleurs de ces plantes sont plus petites que celles des plantes de type sauvage mais présentent un carpelle plus large et contenant plus d'ovules. Cependant, elles produisent des fruits plus petits contenant moins de graines, ce qui est corrélé à une diminution de la fertilité du pollen (figure 35B-E). La longueur des racines et de l'hypocotyle sont plus faibles que ceux des plantes de type sauvage. Enfin, la taille des cellules est également plus faible que celle des plantes de type sauvage.

Pour confirmer ces résultats et évaluer l'effet d'une diminution de l'expression d'*IMA*, des plantes sous-exprimant *IMA* ont été obtenues par transgénése en utilisant des constructions exprimant un ARN antisens ou induisant le mécanisme d'interférence ciblant les transcrits du gène *IMA* par RNAi (Sicard et al., 2008). Les plantes perte-de-fonction pour *IMA* présentent bien une réduction du niveau des transcrits du gène *IMA* allant jusqu'à 80% du niveau observé chez la plante de type sauvage mais ne présentent pas de phénotype particulier associé au développement végétatif. Au contraire, les défauts phénotypiques observés au niveau des fleurs sont remarquables. En effet, les plantes perte-de-fonction produisent des gynécées plus larges dont les stigmates ne sont pas accessibles au pollen, empêchant ainsi l'autopollinisation. Ces plantes peuvent avoir de trois à neuf carpelles fusionnés au lieu de deux. Le méristème floral est plus grand que celui des plantes de type sauvage suggérant une activité plus importante du méristème confirmant l'action inhibitrice d'*IMA* sur l'activité méristématique. Par ailleurs, les ovules sont déformés indiquant l'implication d'*IMA* dans leur développement.

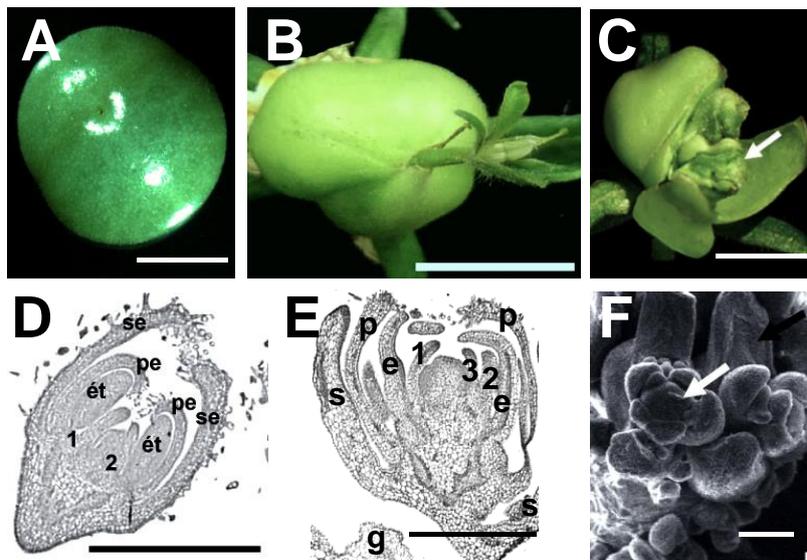


Figure 36 : Phénotypes des fruits de plantes sauvages et $35S::IMA^{ch}$ (d'après Sicard, 2008).

(A-B) : Phénotypes des fruits à 15 jaa de plantes sauvages (A) et $35S::IMA^{ch}$ (B).

(C) Dissection de fruits de plantes $35S::IMA^{ch}$ montrant le développement ectopique d'une fleur de stade 14 à l'intérieur (flèche blanche).

(D) et (E) : Coupes de bourgeons floraux de 2mm de plantes sauvages (D) et d'un bourgeon floral se développant à l'intérieur d'un fruit de plante $35S::IMA^{ch}$ (E).

(F) Images en microscopie électronique à balayage de bourgeons floraux se développant à l'intérieur d'un ovaire de plantes $35S::IMA^{ch}$. On remarque la présence du méristème floral (flèche blanche) et de structures dérivées des téguments (flèche noire).

s : sépale, p : pétale, e : étamine, g : gel, 1,2 et 3 : n° des primordia de carpelles.

La surexpression d'une version chimérique d'IMA (IMA^{ch}) entraîne une altération de la terminaison florale

De façon intéressante, les travaux d'Adrien Sicard ont permis de mettre en évidence que la surexpression d'une version «chimérique» de la protéine IMA permettait d'obtenir des phénotypes importants marquant la perte de terminaison florale. Les ovaires des lignées 35S:IMA^{ch} présentent trois à quatre loges carpellaires contre seulement deux chez les plantes de type sauvage. Dans de rares cas (moins de 1 % des fleurs), l'altération de l'activité méristématique peut conduire à la formation d'un nouvel axe floral au centre de la fleur qui s'allonge pour former une nouvelle fleur en dehors du fruit (**figure 36B**). Cette indétermination du méristème floral est également observable chez les lignées 35S:IMA^{ch} au niveau des fleurs qui se développent à l'intérieur du fruit (**figure 36C et 36F**).

Comme cité précédemment, seules deux structures carpellaires qui fusionnent très tôt au cours du développement des boutons floraux sont initiées au centre de la fleur chez les plantes de type sauvage (**figure 36D**) alors qu'on en compte au moins trois au centre des bourgeons ectopiques des plantes 35S:IMA^{ch}, la troisième structure se formant à l'intérieur de la seconde (**figure 36E**). La perte de la détermination du méristème floral est donc réitérée chez les plantes 35S:IMA^{ch} tout comme la perte de détermination au niveau des ovules.

Ainsi, les phénotypes observés au niveau du fruit lors de la surexpression de la construction 35S:IMA^{ch} est très similaire à ceux du mutant *knuckles* chez *A. thaliana*. En effet, ce dernier se caractérise par une absence de terminaison florale engendrant un phénotype de type « fruit à l'intérieur du fruit ». Ce phénotype spectaculaire obtenu lors de la surexpression du gène chimère IMA^{ch} corrèle bien avec le niveau d'expression du gène chimérique mais ne donne pas lieu à une forte diminution de l'expression du gène IMA endogène. Ces informations semblent aller dans le sens de la création d'un dominant négatif plutôt que d'un silencing. Ainsi, l'hypothèse la plus probable semble être que la protéine chimérique est capable d'aller interagir avec certains des partenaires naturels d'IMA et d'empêcher leur fonction. Cependant, l'hypothèse du recrutement de nouveaux partenaires par la protéine IMA^{ch} ne peut être exclue.

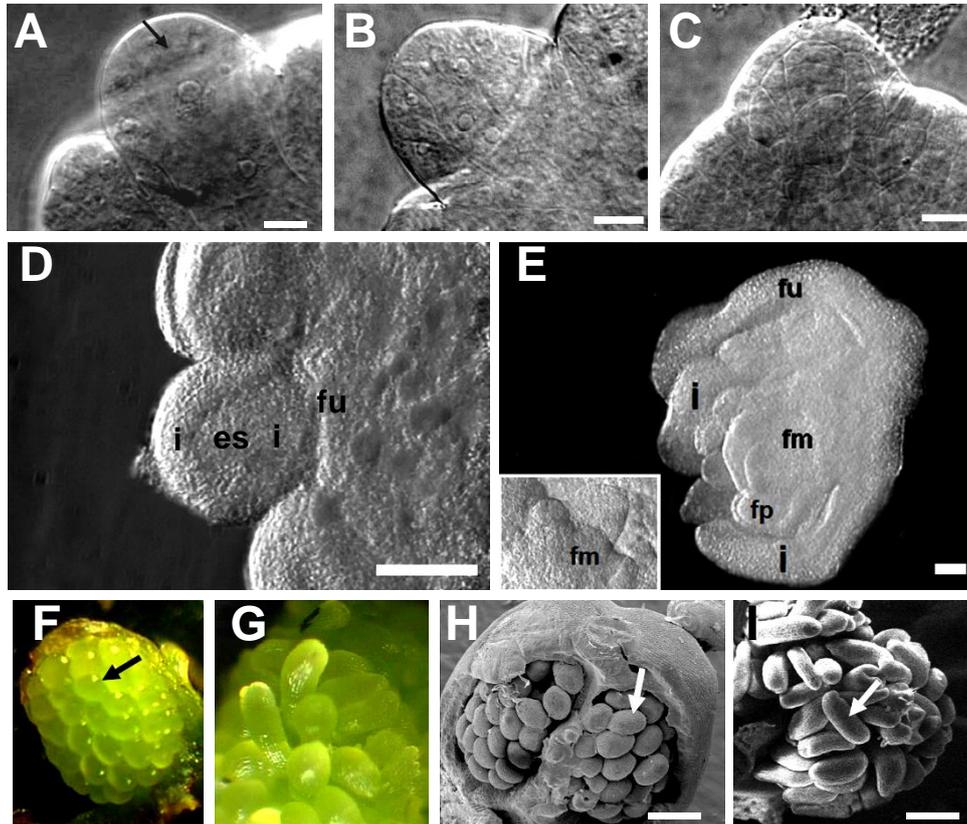


Figure 37 : Développement ovulaire dans les lignées sauvages et $35S::IMA^{ch}$ (d'après Sicard 2008).

(A), (B) et (C) : Primordia d'ovules dans les carpelles de plantes sauvages, $35S::IMA-RNAi$ et $35S::IMA^{ch}$. En (A) la flèche noire indique la cellule mère de la mégaspore. On remarque chez les lignées $35S::IMA-RNAi$ et $35S::IMA^{ch}$ une prolifération importante des cellules du nucelle. Les lignées $35S::IMA^{ch}$ présentent les phénotypes les plus altérés.

(D) et (E) : Ovule mature d'une plante sauvage et $35S::IMA^{ch}$.

(F) : Ovaire de plante sauvage disséqué révélant des ovules de forme ovoïdes (flèche noire).

(G) : Ovule en forme de doigt des lignées $35S::IMA^{ch}$ après dissection de l'ovaire.

(H) : Image en microscopie électronique à balayage d'un ovaire de plante sauvage, la paroi de l'ovaire a été enlevée pour visualiser les ovules (flèche blanche).

(I) : Image en microscopie électronique à balayage d'un ovaire de plante $35S::IMA^{ch}$. On remarque la forme de doigt des ovules (flèche blanche).

Echelle, 200 μ m

***IMA* et le développement des ovules**

Chez les plantes perte-de-fonction *35S::IMA-RNAi* ou *35S::IMA^{ch}*, le développement des ovules durant les stades précoces correspondant principalement à l'émergence des primordia d'ovules à partir du placenta est normal et les ovules ne présentent pas de phénotypes particuliers par rapport à ceux des plantes de type sauvage. À des stades de développement plus tardifs, il n'y a pas de formation de la cellule mère des mégaspores (MMC) dans les lignées perte-de-fonction. À la place, les cellules présentes prolifèrent entraînant la formation d'un massif de cellules indifférenciées (**figure 37A-E**) qui vont ensuite participer au développement de bourgeons floraux à l'intérieur du carpelle (**figure 36F**). Par la suite, la courbure des téguments est incomplète et entraîne la formation d'ovules présentant une morphologie en doigt de gant (**figure 37F-I**).

Ainsi, plusieurs données nous poussent à relier la fonction du gène *IMA* au contrôle du processus de terminaison du méristème floral. En effet, l'importance des modifications phénotypiques causées par la dérégulation du gène *IMA* et le fait que son expression coïncide non seulement avec la diminution de l'activité du méristème floral associée à la répression de *WUS* dans le MF, mais aussi durant le développement des ovules au stade pendant lequel l'expression de *WUS* reprend puis s'arrête à nouveau suggère un rôle potentiel du gène *IMA* lors de la terminaison du méristème floral.

Rôles d'IMA dans la régulation génétique de la terminaison florale

L'analyse précise du profil d'expression du gène *IMA* a permis de montrer qu'il est exprimé dans les tissus en prolifération durant le développement de la fleur et du fruit. Il est exprimé dans tous les organes floraux avec une intensité variable, plus forte dans les pétales et les carpelles (**figure 38A**). Son expression dans le fruit suit une courbe en cloche atteignant un maximum à 10 jours après anthèse, stade marquant la transition entre les phases de division et d'expansion cellulaires du développement du fruit (**figure 38B**). Ces informations soulignent le rôle d'*IMA* dans les phases de reproduction et particulièrement dans les tissus au moment de la transition entre division et différenciation cellulaire. Ainsi, l'homologie entre *IMA* et *MIF2* est aussi soutenue par des profils d'expression équivalents. Il est intéressant de noter que le gène *SIMIF1* présente un profil d'expression également similaire à celui de son homologue

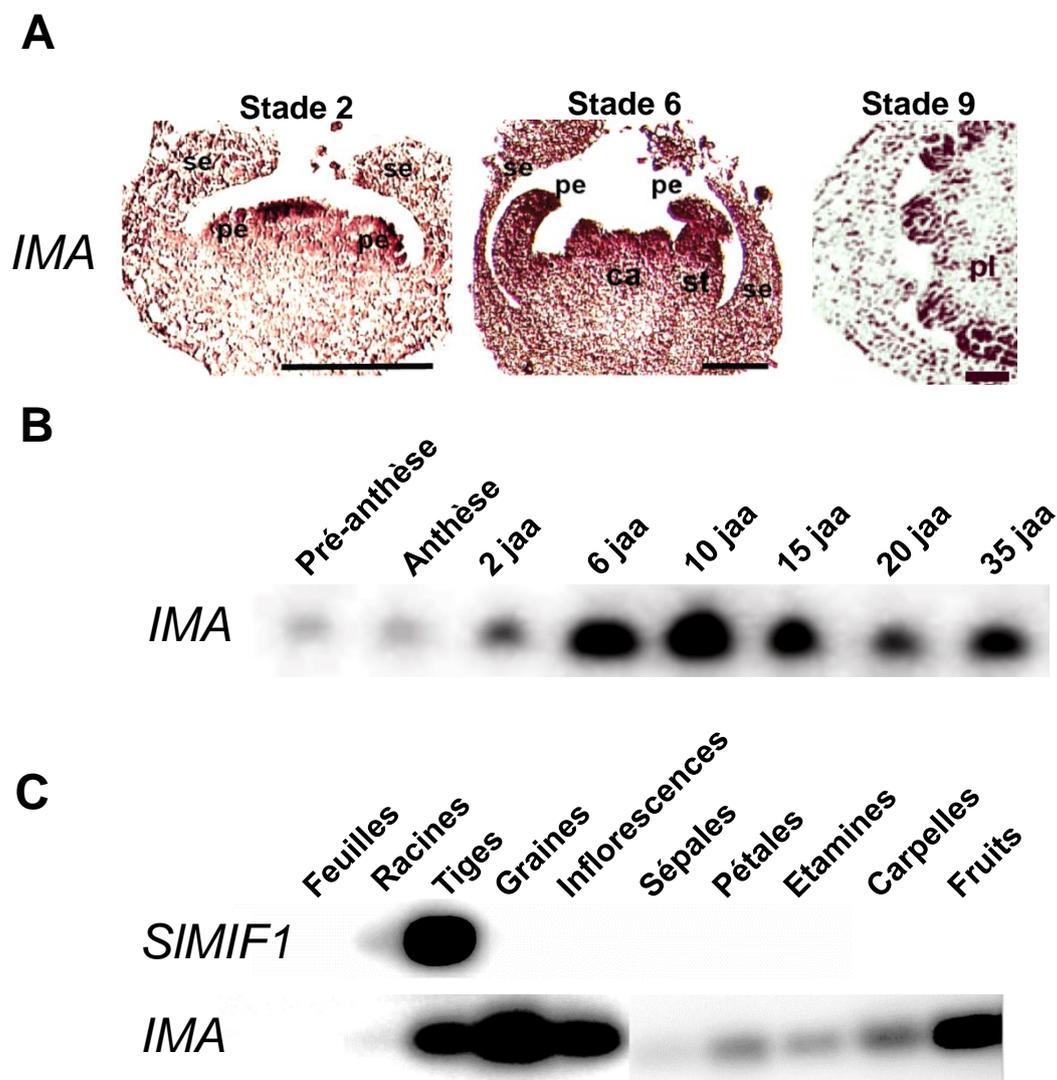


Figure 38 : Profils d'expression des gènes *IMA* et *SIMIF1* chez la Tomate (d'après Sicard *et al.*, 2008).
 (A) Profils d'expression du gène *IMA* au cours du développement floral précoce par hybridation *in situ*. L'expression du gène *IMA* débute tôt dans le développement floral au centre du MF puis se concentre dans les primordia de pétales, d'étamines et de carpelles au sein desquels il sera exprimé dans les ovules en développement.
 (B) Expression du gène *IMA* au cours du développement du fruit. Après anthèse, le gène *IMA* est fortement exprimé dans le fruit et atteint un maximum durant la phase de division, son expression décroît ensuite lors de la phase d'expansion.
 (C) Expression des gènes *SIMIF1* et *IMA* au sein de différents tissus. Comme leurs homologues chez *A. thaliana*, le gène *IMA* est majoritairement exprimé dans la tige et les organes floraux, et à l'inverse, le gène *SIMIF1* est majoritairement exprimé dans les tissus végétatifs, les tiges et les racines.

MIF1 chez *A. thaliana*, à savoir uniquement dans les tissus végétatifs et particulièrement dans la tige. Son expression n'a pu être détectée dans les fleurs et fruits (**figure 38C**).

Afin d'expliquer l'effet d'*IMA* sur la diminution de l'activité méristématique, l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le développement de la fleur chez les plantes gain- et perte-de-fonction pour le gène *IMA* a été étudiée (**Sicard et al., 2008**). L'expression de l'orthologue de *WUS* chez la tomate, *SIWUS* (**Wang et al., 2011**) est fortement augmentée chez les plantes perte-de-fonction (**figure 39**) (**Sicard et al., 2008**) au moment de la terminaison du méristème floral et au moment du développement des ovules pendant lequel il doit normalement s'arrêter permettant ainsi la différenciation des cellules du sac embryonnaire chez les plantes de type sauvage.

Ces données sont cohérentes avec le maintien de la prolifération des cellules souches méristématiques et du développement de bourgeons floraux de manière itérative au sein des fruits en développement. L'ensemble de ces données va dans le sens d'une action inhibitrice d'*IMA* sur l'expression de *SIWUS* tant au niveau des méristèmes floraux qu'au niveau des ovules.

Par ailleurs, Sicard et ses collaborateurs ont aussi montré que la surexpression d'*IMA* entraîne l'activation de l'expression du gène de la fonction D *TAg11*, orthologue de *SEEDSTICK* (*STK*) chez *A. thaliana* au niveau des domaines présomptifs où se forment les ovules (**figure 39**). Cette relation entre le gène *IMA* et un gène impliqué dans l'identité des ovules corrobore l'effet de la surexpression d'*IMA* sur la modification du nombre d'ovules. L'ensemble de ces résultats indique qu'au cours de la terminaison du méristème floral, le gène *IMA* participerait à un réseau de régulation impliquant les gènes de la fonction D et aboutissant à la répression de *SIWUS*. L'absence d'effet de la sur-expression du gène *IMA* sur les niveaux d'expression des gènes *TM29* et *TAG1* indique qu'*IMA* intervient dans le contrôle du programme génétique du développement floral et des ovules par une voie différente ou en aval des gènes de la fonction C et E.



Figure 39 : Territoires d'expression des gènes *SIWUS*, *TAG1* et *TAG11* chez les plantes sauvages, perte-de-fonction *35S::IMA-RNAi* et gain-de-fonction *35S::IMA* par hybridation *in situ* (d'après Sicard *et al.*, 2008).

(*SIWUS*) : détection des ARNm du gène *SIWUS*. L'expression du gène *SIWUS* est maintenue plus tardivement dans le centre organisateur chez les plantes *35S::IMA-RNAi*. À l'inverse, la surexpression du gène *IMA* entraîne un arrêt précoce de l'expression d'*SIWUS*. Cela indique le rôle d'*IMA* dans la répression de *SIWUS*.

(*TAG1*) : détection des ARNm du gène *TAG1*. L'expression de *TAG1* ne semble pas perturbée dans les lignées *35S::IMA* ou *35S::IMA-RNAi*.

(*TAG11*) : détection des ARNm du gène *TAG11*. L'expression de *TAG11* est fortement augmentée et étendue chez les plantes *35S::IMA* tandis qu'elle est réduite chez les plantes *35S::IMA-RNAi* indiquant un rôle d'*IMA* dans l'induction de l'expression du gène *TAG11*.

Présentation du travail de thèse

L'intérêt du laboratoire pour le rôle de la protéine IMA dans le processus de terminaison florale a été originellement déterminé par son impact potentiel dans le déterminisme de la taille du fruit en contrôlant le nombre de carpelles qui peuvent être produits au centre de la fleur.

Nous l'avons vu, la terminaison florale met en jeu un réseau de régulation complexe aujourd'hui bien décrit chez *A. thaliana* aboutissant à l'arrêt du maintien de la prolifération des cellules souches méristématiques en favorisant l'inhibition de l'expression du gène *WUS*. Les travaux effectués dans l'équipe OrFE (ORganogenèse du Fruit et Endoréduplication) de l'UMR1332 ont permis de mettre en évidence la participation du gène *IMA* dans ce réseau de régulation. En effet, les travaux effectués par A. Sicard dans le cadre de sa thèse (**Sicard A., 2007 et Sicard et al., 2008**) ont permis de montrer qu'*IMA* participait à la régulation de l'expression du gène *SIWUS* (**figure 39**).

Au début de ma thèse, aucun travail équivalent n'avait été réalisé sur le gène *MIF2* chez *A. thaliana*. Ainsi, la question se posait non seulement de l'équivalence fonctionnelle des gènes *IMA* et *MIF2*, mais aussi de l'implication de *MIF2* dans l'inhibition de *WUS* et de la place de *MIF2* dans le réseau de régulations mis en jeu au cours de la terminaison du méristème floral chez *A. thaliana*.

Pour ce faire, il était nécessaire de préciser le rôle de *MIF2* dans la régulation de l'expression du gène *WUS*, et de vérifier si le gène *MIF2* peut être considéré comme l'orthologue du gène *IMA*. Pour cela, des analyses d'expression précises des différents gènes clés étaient nécessaires et devaient être effectuées chez des plantes sauvages, perte- et gain-de-fonction pour *MIF2*. Cependant, comme cité précédemment, aucun mutant perte-de-fonction pour *MIF2* n'étant disponible, la création de plantes sous-expresssurs a été entreprise par une approche utilisant un amiRNA (artificial micro RNA) (**Schwab et al., 2006**) mais dont l'expression était suffisamment spécifique au niveau du développement floral pour éviter d'affecter des processus pouvant conduire à la létalité des plantes présentant une perte-de-fonction complète pour le gène *MIF2*. Ainsi, l'expression du amiRNA ciblant les ARNm de *MIF2* a été placé sous le contrôle d'un promoteur spécifique de la fonction B, le

promoteur du gène *PISTILLATA*, dont l'expression est susceptible de correspondre temporellement à la mise en place de la terminaison du méristème floral. La création de ces plantes, leur analyse ainsi que l'étude de l'expression de *MIF2* chez différents mutants des gènes *WUS*, *AG* et *KNU* intervenant dans la régulation de la terminaison du méristème floral ont été réalisées afin de préciser les relations d'épistasie qui pouvaient exister entre ces différents acteurs et d'intégrer *MIF2* dans le réseau de régulation de la terminaison du méristème floral.

La proximité structurale du facteur de transcription à zinc finger *KNU* et des protéines ZHD et son implication dans la terminaison florale constituait un argument pour tester l'hypothèse de son interaction avec la protéine *MIF2* et ainsi préciser leur rôle réciproque dans le processus de terminaison florale. Ainsi la capacité d'interaction de la protéine *MIF2* avec la protéine *KNU* a été testée et validée. Les résultats obtenus nous ont ensuite orientés vers l'étude d'autres partenaires parmi lesquels les protéines *TPL* et *HDA19* et vers une régulation épigénétique au locus *WUS*.

La découverte d'une intervention commune de *MIF2* et de *KNU* dans la répression de *WUS* chez *A. thaliana* nous a permis de revenir sur notre modèle initial, la Tomate. Ainsi l'homologue du gène *KNU* chez la Tomate a été recherché et son équivalence fonctionnelle a été validée permettant d'identifier un nouvel intervenant du réseau génétique de la terminaison du méristème floral chez la tomate, le gène *SIKNU*, impliqué dans la répression du gène *SIWUS*.

Le large spectre d'interactants décrits pour les protéines *MIF* et l'effet pléiotrope qu'entraîne leur surexpression suggèrent une intervention plus large de ces protéines dans le développement de la plante. L'intervention des protéines *IMA* ou *MIF2* dans la réponse hormonale et notamment dans la voie des gibbérellines avait déjà été abordée dans les thèses précédentes (**Sicard, 2008 et Leblond, 2011**) et j'ai pu compléter par de nouveaux résultats les données déjà acquises sur ce sujet. J'ai également pu tester l'hypothèse de l'implication de la protéine *MIF2* dans le développement des pétales et des étamines au travers de la régulation des gènes de la fonction B, *APETALA3* et *PISTILLATA*.

Par ailleurs, afin de mieux comprendre les spécificités structurales qui caractérisent les protéines MIF, des analyses de structure, de désordre intrinsèque, de phosphorylation et d'interactions ont été effectuées. Elles m'ont permis de montrer que la capacité d'interaction et la localisation subcellulaire des protéines MIF est probablement dépendante de phosphorylations d'acides aminés présents dans les régions désordonnées des extrémités N- et C-terminales des protéines MIF.

L'ensemble des résultats acquis suggèrent un rôle conservé des protéines IMA et MIF2 chez la Tomate et *A. thaliana* faisant de ces petites protéines, de grands acteurs du développement floral et de l'organogenèse.

Chapter 2



Results and discussion

Part I: Characterization of IMA and MIF2 function

Role of IMA and MIF2 in floral stem cell maintenance termination

As previously mentioned in the introduction section, floral termination involves a complex regulatory network necessary for the precise timing of *WUS* repression in the floral meristem. In this network, *AGAMOUS* plays a central role as a direct repressor of *WUS* expression but also as an indirect repressor through the activation of another gene, *KNUCKLES*. Despite recent findings dealing with the molecular mechanism of *WUS* repression, describing many proteins involved (for a review see **Sun and Ito 2015**), we are still far from having a comprehensive view of the genetic network controlling floral stem cell maintenance termination. Therefore, in order to gain a broader insight into this regulatory network, a deeper knowledge about each protein involved is needed.

In 2007, A. Sicard demonstrated the involvement of the tomato protein IMA in the floral meristem termination regulatory network as a player in *SIWUS*-repression pathway. However, until now, it has not been shown how IMA can act as a *SIWUS* repressor. For sure IMA is not a transcription factor because it lacks a DNA fixation domain. In *Arabidopsis* such role for the IMA homolog gene *MIF2* was not reported and led us to wonder about the functional homology of these two genes in the floral termination pathway.

Because our knowledge about the conservation of the floral termination network between Tomato and *A. thaliana* is quite sketchy, it was necessary to work on both species in parallel to decipher the functional homology between IMA and MIF2 in this process. Moreover, it was particularly rewarding to take advantage of the complementary tools available in the two species to strengthen our hypotheses.

This first part of the results and discussion section corresponds to an article which has been submitted to *Genes and Development*, describing the involvement of IMA and MIF2 in the floral stem cell maintenance termination using both tomato and *A. thaliana* as model plants. The Material and Methods part is shown separately (see Material and Methods section).

Article 1: The arrest of stem cell maintenance in floral meristem requires the regulation of WUSCHEL via a chromatin remodeling complex made of KNU, TPL, HDA19 and MIF2/IMA proteins

Norbert Bollier^{1a}, Adrien Sicard^{1b}, Julie Leblond^a, David Latrasse^c, Frédéric Gévaudant^a, Moussa Benhamed^c, Cécile Reynaud^c, Michael Lenhard^b, Christian Chevalier^a, Michel Hernould^{a,*} and Frédéric Delmas^a

^aUMR1332 BFP, INRA, Univ. Bordeaux, 33882 Villenave d'Ornon Cedex, France.

^bInstitut für Biochemie und Biologie, Universität Potsdam, Karl-Liebknecht-Strasse 24-25, Haus 26, 14476 Potsdam-Golm, Germany

^cInstitut of Plant Sciences Paris-Saclay (IPS2), UMR 9213/UMR1403, CNRS, INRA, Université Paris-Sud, Université d'Evry, Université Paris-Diderot, Sorbonne Paris-Cité, Bâtiment 630, 91405 Orsay, France

¹These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author: hernould@bordeaux.inra.fr

Abstract

In most angiosperm species, the gynoecium is the last structure to develop within the flower, due to the determinate fate of the floral meristematic stem cells. The maintenance of the stem cell activity before its arrest at the stage called floral meristem termination, impacts directly the number of carpels. At this stage, the necessary inhibition of *WUSCHEL* (*WUS*), the gene responsible for the maintenance of the stem cell activity within the floral meristem, involves a two-step mechanism: first through a direct repression mediated by the MADS domain transcription factor *AGAMOUS*, and next through an indirect repression requiring the C₂H₂ Zinc-finger *KNUCKLES* (*KNU*) protein, allowing complete termination of the floral stem cell maintenance. Here, using *A. thaliana* and tomato as model plants, we report that the *MIF2* (MIn zinc Finger 2) and *IMA* (INHIBITOR of MERISTEM ACTIVITY) proteins act during the floral meristem termination process as adaptor proteins, recruiting *KNUCKLES* and *SIKNUCKLES* respectively, in a transcriptional repressor complex together with *TOPLESS* (*TPL*) and *HISTONE DEACETYLASE19* (*HDA19*). This complex binds to the *WUS* locus leading to *WUS* repression via a chromatin deacetylation mechanism. These data provide novel insights in the molecular mechanisms governing floral termination, and highlight the role of *MIF2/IMA* during this essential step of flower development that determines carpel number and therefore fruit size.

Introduction

The fruit is a specialized organ, which results from the development of the ovary following successful flower pollination and fertilization, providing a suitable environment for seed maturation and dispersion (**Seymour et al., 2013**). Despite a similar organization (corresponding to a pistil resulting from the fusion of two carpels), the gynoecium in *Arabidopsis thaliana* and tomato (*Solanum lycopersicum*) flowers evolves after fertilization towards respectively a dry silique made of two seeded valves and a fleshy berry made of two seeded locules. The fruit organogenesis starts very early during flower development, when carpels arise from the floral meristem (FM). The specific stage of floral development when the number of carpels (consequently the number of fruit valves/locules) is determined, corresponds to the arrest of stem cell proliferation within the FM: this process is called FM termination (Sun and Ito, 2015). In *Arabidopsis thaliana*, the transcription factor WUSCHEL (*WUS*) specifies the maintenance of stem cell activity in the shoot apical and floral meristems. In cooperation with the FM regulator *LEAFY*, *WUS* activates the *AGAMOUS* (*AG*) gene in stamen and carpel primordia (**Lenhard et al., 2001; Lohmann et al., 2001**). *AG* then initiates the reproductive development and at the same time, antagonizes *WUS* activity to terminate the meristem. The complete inhibition of *WUS* expression is then essential to promote sharp developmental transitions and regulate the total number of flower organs (**Sun and Ito, 2015**). In *A. thaliana* the loss-of-function of *WUS* results in the production of flowers lacking carpels and most of the stamens; while a gain-of-function of *WUS* leads to an increased number in floral organs, and in some cases the reiteration of a flower inside the flower (**Xu et al., 2005**).

The MADS box transcription factor *AGAMOUS* (*AG*) thus plays a central role in the repression of *WUS* during flower development, according to a two-step process. Firstly, *AG* represses directly the *WUS* locus during the early stages of FM termination (stage 3) (**Liu et al. 2011**). This binding of *AG* to the *WUS* locus mediates the recruitment of CURLYLEAF, a core component of the Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2), and the subsequent deposition of Histone H3-lysine27 tri-methylation ($H_3K_{27}me_3$) repressive marks. PRC1 components, namely TERMINAL FLOWER2 (*TFL2*)/LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN1 (*LHP1*), will then recognize the $H_3K_{27}me_3$ marks and promote the compaction of chromatin to ensure the stable repression of *WUS* (**Liu et al. 2011**). This mechanism is however insufficient for FM termination. The complete arrest of *WUS* expression at floral stage 6 requires another

transcription factor belonging to the C₂H₂ zinc finger protein family, named KNUCKLES (KNU) (Payne *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2009). The expression of *KNU* is directly induced by AG at stages 5–6, and a mutation in *KNU* results in an increased number of carpels and stamens due to a prolonged expression of *WUS*. Other factors have been identified to be required for fine-tuning floral stem cell activities (see Sun and Ito, 2015 for a review). However the mechanism by which KNU represses *WUS* remains unknown and whether the above mechanisms can be extended to other plant species needs to be investigated.

In tomato, nucleotidic polymorphisms at the *SIWUSCHEL* (*SIWUS*) locus underly variations in fruit locule number between Tomato cultivars (Munos *et al.*, 2011). The increase in fruit locule number associated with this polymorphism results in an approximate 30%-yield increase in terms of fruit production. But despite its inferred agronomical interest, the mechanism underlying *SIWUS* regulation in tomato, and more generally of FM termination, is still not well understood. We previously demonstrated that the INHIBITOR OF MERISTEM ACTIVITY (IMA) protein which belongs to the MIn zinc Finger (MIF) protein family was involved in FM termination in tomato as an indirect repressor of *SIWUS* (Sicard *et al.*, 2008). So far, the function of the MIF2 homolog protein in the FM termination process has never been investigated in *Arabidopsis*.

In the present study, we used a back-and-forth approach between *Arabidopsis* and tomato to investigate the FM termination process and implement our knowledge gained in the two species. We here demonstrate that *A. thaliana* MIF2 and its tomato ortholog IMA are activated by AGAMOUS during flower development, most likely through a direct interaction to their promoter. MIF2 and IMA proteins interact respectively with the transcriptional repressors KNU and SIKNU, allowing the recruitment of chromatin remodeling complex at the *WUS* locus and its subsequent repression via a histone deacetylation mechanism. In the light of these observations, we propose that MIF2 and IMA proteins act as adaptor proteins between transcriptional regulators and chromatin remodeling proteins to ensure the proper termination of stem cells activity within FM in angiosperm species.

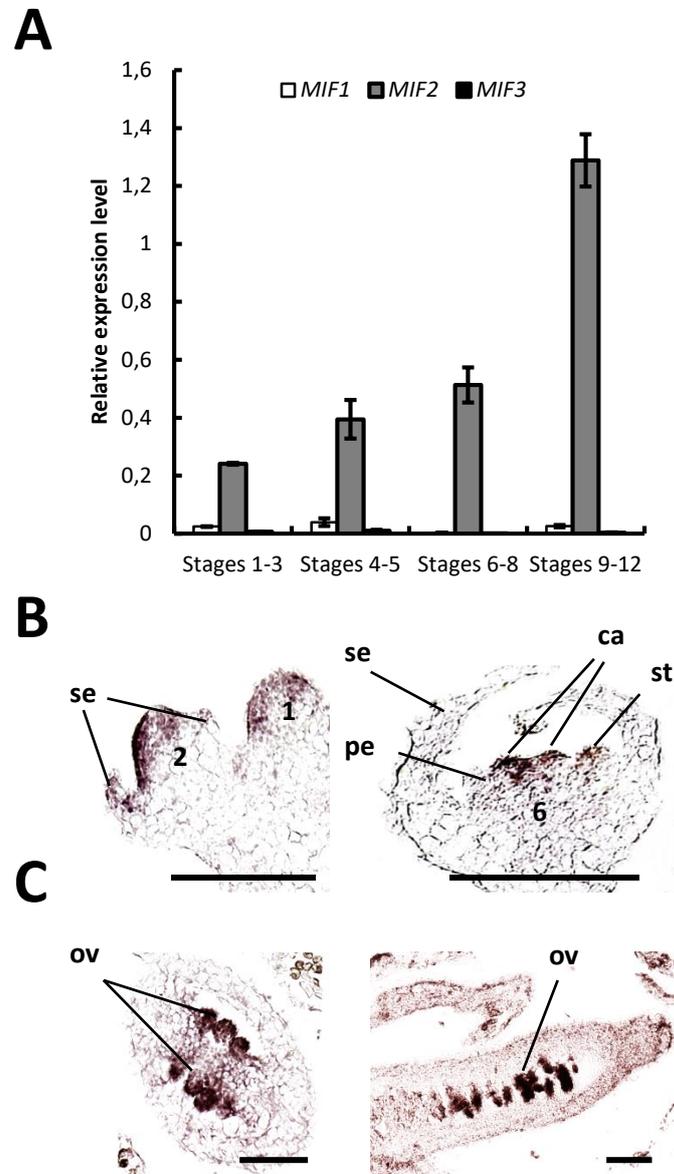


Figure 40: MIF2 is the only flower-specific MIF gene in *A. thaliana*.

(A) Comparison of *MIF1*, *MIF2* and *MIF3* mRNA abundance in Col-0 flower buds at various developing stages, using quantitative real time RT-PCR.

(B) *MIF2* expression analysis by *in situ* hybridization in *Arabidopsis* Col-0 developing flower buds at stage 1 and stage 2 (left panel), and stage 6 (right panel). se: sepal; pe:petal, st: stamen; c: carpel. Bar, 100 μ m.

(C) *MIF2* expression analysis analysis by *in situ* hybridization in ovary of *Arabidopsis* Col-0 developing flower buds at stage 10. Left panel: transverse section of the ovary; Right panel: longitudinal section of the ovary. ov: ovule. Bar, 100 μ m.

Results and discussion

*A conserved regulatory network regulates FM termination in both *A. thaliana* and *S. lycopersicum**

Since the MIn zinc Finger (MIF) protein INHIBITOR of MERISTEM ACTIVITY (IMA) protein regulates FM termination in tomato (**Sicard *et al.*, 2008**), we investigated the putative conservation of this function in Arabidopsis. The MIF protein family in Arabidopsis encompasses three members: MIF1, MIF2 and MIF3 (**Hu and Ma, 2006**). *MIF1* and *MIF3* are mostly expressed in vegetative parts whereas *MIF2* is preferentially expressed in reproductive organs (**Hu and Ma, 2006; Arabidopsis eFP Browser; Winter *et al.*, 2007**). The expression levels of *MIF1*, *MIF2* and *MIF3* were assessed during floral development using real-time RT-qPCR analysis (**figure 40A**). *MIF2* expression increased gradually during flower development, while *MIF1* and *MIF3* expression levels were barely detectable, at all tested developmental stages. This expression pattern suggested that MIF2 may also be involved in the regulation of flower development in *A. thaliana*.

MIF2 transcripts were detected very early during floral development, from stage 1 and until stage 5, in the apical part of FM and at the location of layers 1 to 3 (**figure 40B**). At stage 6, corresponding to the initiation of carpel primordia, the expression signal became more intense within the central cells of the meristem, within and between the two carpel primordia (**figure 40B**). Once the formation of the four whorls is initiated, *i.e.* from stage 6 and until the end of floral development, *MIF2* expression was restricted to the developing ovules in the ovary (**figure 40C**). Therefore, MIF2 expression appeared to be regulated according to a precise pattern during floral development and was mainly associated to early carpel and ovule development. Moreover, this pattern of expression resembled that of *IMA*, its closest homolog in tomato (**Sicard *et al.*, 2008**), suggesting a conserved functional role for MIF2 and IMA.

To examine whether *MIF2* is also involved in the regulation of flower development, we performed a functional analysis of *MIF2* in *A. thaliana*. So far, no *MIF2* knock-out lines or t-DNA insertion mutant lines were available in *Arabidopsis*. Constitutive knock-down approaches (RNAi or antisense lines) failed to produce transformed plants displaying a strong reduction in *MIF2* transcript level. Up to now this lack of loss-of-function plants has therefore

Figure 41: *MIF2* loss-of-function using an amiRNA under the floral specific promoter *PISTILLATA* leads to multicarpellar flower.

(A-D) *GUS* staining in *pPI::GUS* inflorescence.

(A) Flower buds at stage 6.

(B) Flower buds at stage 7.

(C) Flower buds at stage 14.

(D) Flower at anthesis.

(E-F) *pPI::amiRNA-MIF2* flower phenotype.

(E) Flower buds at stage 11.

(F) Flower buds at stage 14. Note that four carpels are visible.

Bars, (A-B) 100 μ m ; (C-F) 1mm

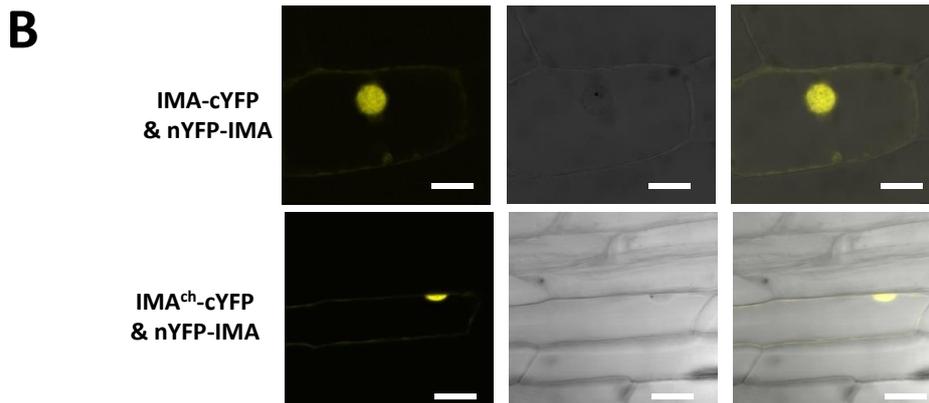
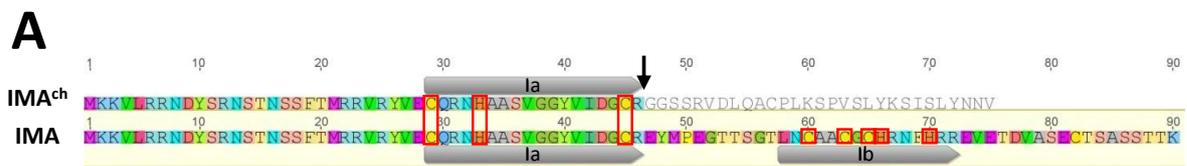
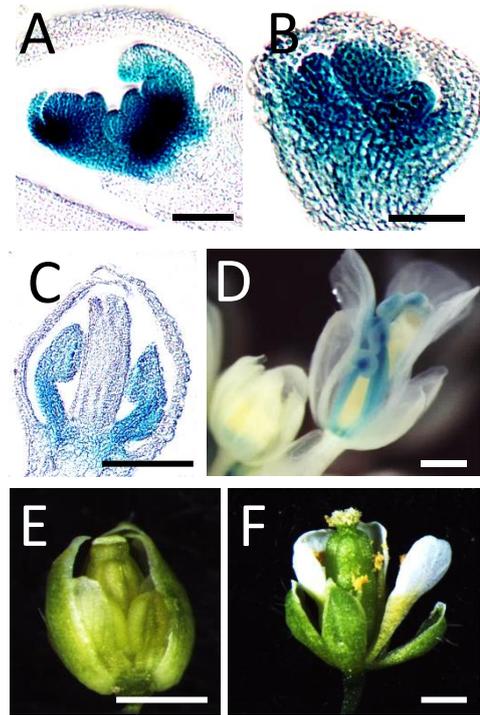


Figure 42: The chimeric IMA protein (IMA^{ch}) only contains a part of IMA zinc finger but is still able to interact with IMA native protein

(A) Primary sequence of the chimeric IMA protein (IMA^{ch}) compared to the WT IMA protein.

The position of the mock peptide insertion in IMA^{ch} is indicated by an arrowhead. Cysteine and Histidine residues of the two parts of the C₅H₃ zinc finger domain (Ia and Ib) are highlighted.

(B) BiFC analysis of the interaction between IMA and itself (upper panels) and IMA^{ch} and IMA (lower panels) in onion epidermal cells.

Bars, 50 μ m.

prevented the study of *MIF2* biological function as acknowledged by Hu and Ma (2006). In tomato, only partial loss-of-function plants could be obtained using both RNAi and RNA antisense strategies (Sicard *et al.*, 2008). Since *MIF2* and *IMA* are strongly expressed during ovule/seed development in both species, it may well be that the complete loss-of-function impairs the development of transgenic seedlings.

To circumvent this difficulty, we decided to reduce specifically *MIF2* expression during flower development using a promoter that is not expressed during ovule/seed development. To this end, we expressed an artificial microRNA (Schwab *et al.*, 2006 ; Ossowski *et al.*, 2008) specifically directed against *MIF2* mRNA under the control of a 800 bp-long sequence from the *PISTILLATA* promoter (*pPI*) (Honma *et al.*, 2000) to generate the *pPI::amiRNA-MIF2* transgenic lines. As a control, we confirmed that *pPI* drives a strong *GUS* reporter gene expression signal within the inflorescence meristem and in young flower buds, notably at the stage when FM termination occurs, while no expression was detected in the developing ovule/seed (figure 41). Compared to the wild type cross between Col-0 and Ler (named Col*Ler, genetic background of the *pWUS::GUS* construct from P. Laufs) most of the flowers from the *pPI::amiRNA-MIF2* plants displayed an increased number of carpels (four instead of two carpels) (figure 43A-E). As a consequence, tetralocular siliques containing four rows of seeds and four valves separated by three or four septa were obtained (figures 43C and 43E). This defect in FM termination correlated with a strong reduction in endogenous *MIF2* expression in *pPI::amiRNA-MIF2* plants when compared to WT plants (~10 fold before stage 9; ~19 fold during stages 10-13; ~4 fold during stages 13-16) (figure 43F), witnessing the strong amiRNA effect against *MIF2* transcript accumulation. Such an indeterminate phenotype inducing multicarpellar fruit was also observed in tomato expressing a *35S::IMA-RNAi* construct (Sicard *et al.*, 2008): fruits made of six carpels instead of two were obtained (figure 43H), as a result of the reduction in *IMA* transcript abundance (~5 fold compared to WT) (figure 43J). Additionally, we generated transgenic tomato plants referred to as *35S::IMA^{ch}* lines, ectopically expressing a chimeric version of IMA (*IMA^{ch}*) in which the distal half part of the protein was replaced by a mock sequence. As a result the chimeric sequence only harbored the first sub-domain of the C₅H₃ zinc finger domain (figure 42A). In addition to the indeterminate phenotype inducing multicarpellar fruit, the expression of the chimeric *IMA^{ch}* transgene induced a conversion of the ovules into floral buds (figures 43L and 43M). In some

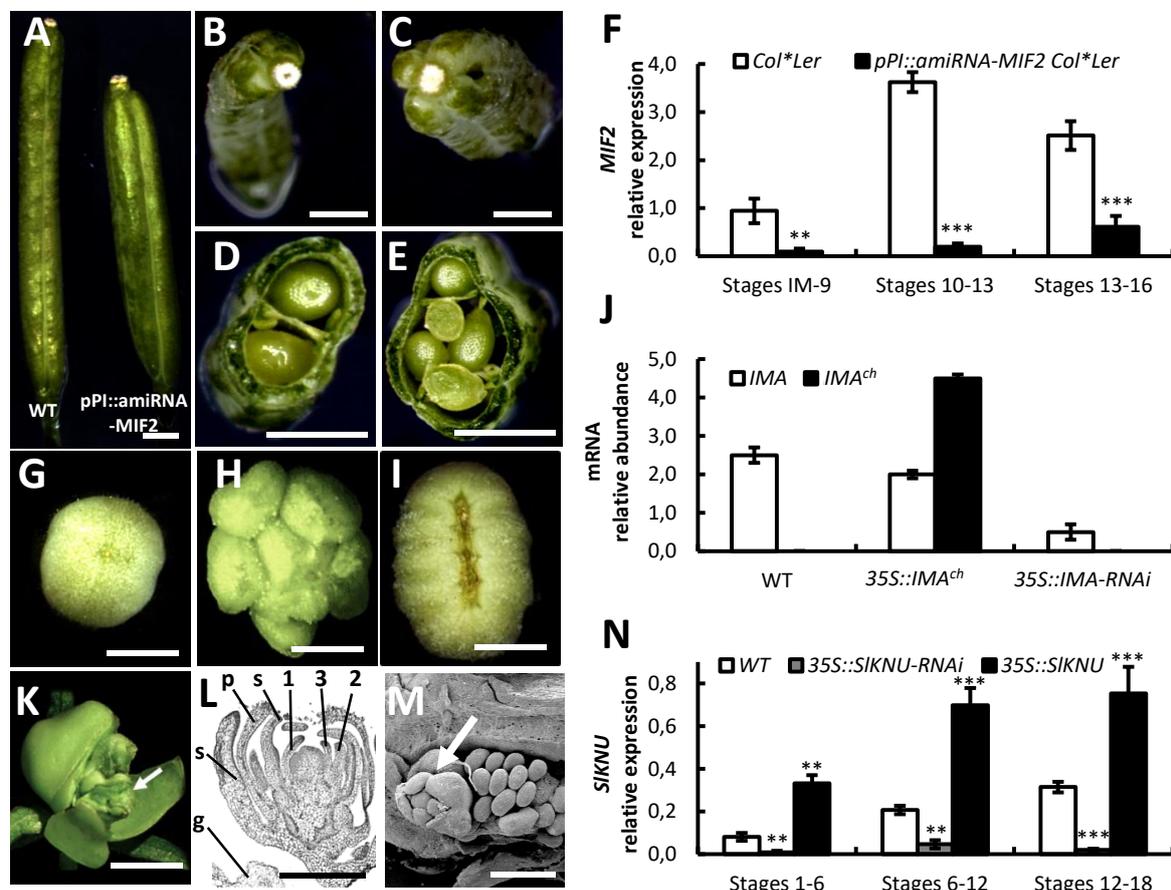


Figure 43: *MIF2* and *IMA* loss-of-function plants develop multicarpellar fruit in *A. thaliana* and tomato respectively.

(A-E) Siliques from *pPI::amiRNA-MIF2* plants display a tetralocular phenotype (right in (A) and (C)) compared to Col*Ler WT plants (left in (A) and (B)). Cross-sections of *pPI::amiRNA-MIF2* siliques revealed the presence of four rows of seeds, four valves and four loculi separated by three or four septa (E), compared to Col*Ler WT siliques (D). Bars, 1mm (A); Bars, 2mm (B-E).

(F) *MIF2* expression analysis in *pPI::amiRNA-MIF2* plants compared to Col*Ler WT plants at various stages of flower development, using quantitative real time RT-PCR.

(G-I) Young fruits from *35S::IMA-RNAi* plants (H) and *35S::SIKNU-RNAi* plants (I) show an increased number of carpels compared to wild-type plants (G). Bars, 1mm (G-I).

(J) Relative abundance of *IMA* and chimeric *IMA^{ch}* transcripts in *35S::IMA^{ch}* and *35S::IMA-RNAi* plants compared to wild-type plants, using RT-PCR.

(K) Dissected fruit from the *35S::IMA^{ch}* line showing an ectopic stage-14 floral bud (white arrow). Bars, 5mm.

(L) Cross-section of a floral bud developing inside a *35S::IMA^{ch}* fruit. Bars, 100µm.

(M) Scanning electron micrograph of an ovary from *35S::IMA^{ch}* plant. Note the FM (white arrow) deriving from the ovules. s: sepal; p: petal; e: stamen; g: gel; 1,2,3: carpel primordia. Bars, 500µm.

(N) *SIKNU* expression analysis in WT, *SIKNU-RNAi* and *35S::SIKNU* lines

Error bars represent SD of three biological replicates and asterisks indicate significant differences from the control (WT) using two-tailed t-test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

cases it could give rise to the production inside the fruit of complete floral buds, with developing sepals, petals, stamens and carpels (**figure 43K and 43L**). These ectopic flower buds were able to develop almost normally, and could even display an iterative “Matriochka-Russian-doll” phenotype: namely ectopic flower buds inside their own carpels, and so on. In these *35S::IMA^{ch}* plants, the endogenous *IMA* gene was normally expressed (**figure 43J**), suggesting that the chimeric version of IMA acts as a dominant-negative mutant protein which could induce much more severe modifications in ovule development than the sole decrease of *IMA* expression as observed in antisense RNA and RNAi plants (**Sicard et al., 2008**). Taken together, these results indicate that *MIF2* in *Arabidopsis* and *IMA* in tomato are both involved in carpel and ovule development and are functional homologs.

Isolation and characterization of the tomato KNUCKLES ortholog

The C₂H₂-ZINC FINGER protein KNUCKLES (KNU) which has also been shown to regulate FM termination displays a very similar expression pattern to *MIF2* (**Payne et al., 2004**), suggesting that they could both act within the same genetic pathway. We next investigated whether the function of KNU is conserved between *A. thaliana* and *S. lycopersicum*, and whether a KNU loss-of-function in tomato may lead to similar indeterminate phenotype that the one observed in *35S::IMA-RNAi*.

For this purpose, we searched for putative homologs for the *Arabidopsis* *KNU* in the available full tomato genome sequence (The Tomato Genome Consortium, 2012). Three distinct homologous sequences were identified: one named Solyc00g014800, localized on the artificial pseudomolecule composed of scaffolds that could not be placed on either of the 12 tomato chromosomes defined as chromosome 0 : Solyc00g014800 (Tomato Genome Consortium, 2012); one on chromosome 12 at positions SL2.50ch12:51560501-51562100; one on chromosome 2 at positions SL2.50ch02:54952316..54952822)(**figure 44A**). These three sequences displayed an amino-acid sequence identity with KNU of 27%, 27% and 33% respectively, but share a very conserved C₂H₂ zinc finger domain (**figure 44B**). However the two former sequences (Solyc00g014800 and SL2.50ch02:54952316..54952822) did not exhibit the presence of a conserved EAR domain which is characteristic of the KNU protein (**Payne et al., 2004**). Moreover in our hands, a functional analysis of Solyc00g014800 either by overexpression or RNAi loss-of-function did not lead to any phenotypical alterations in flower development in tomato (data not shown).

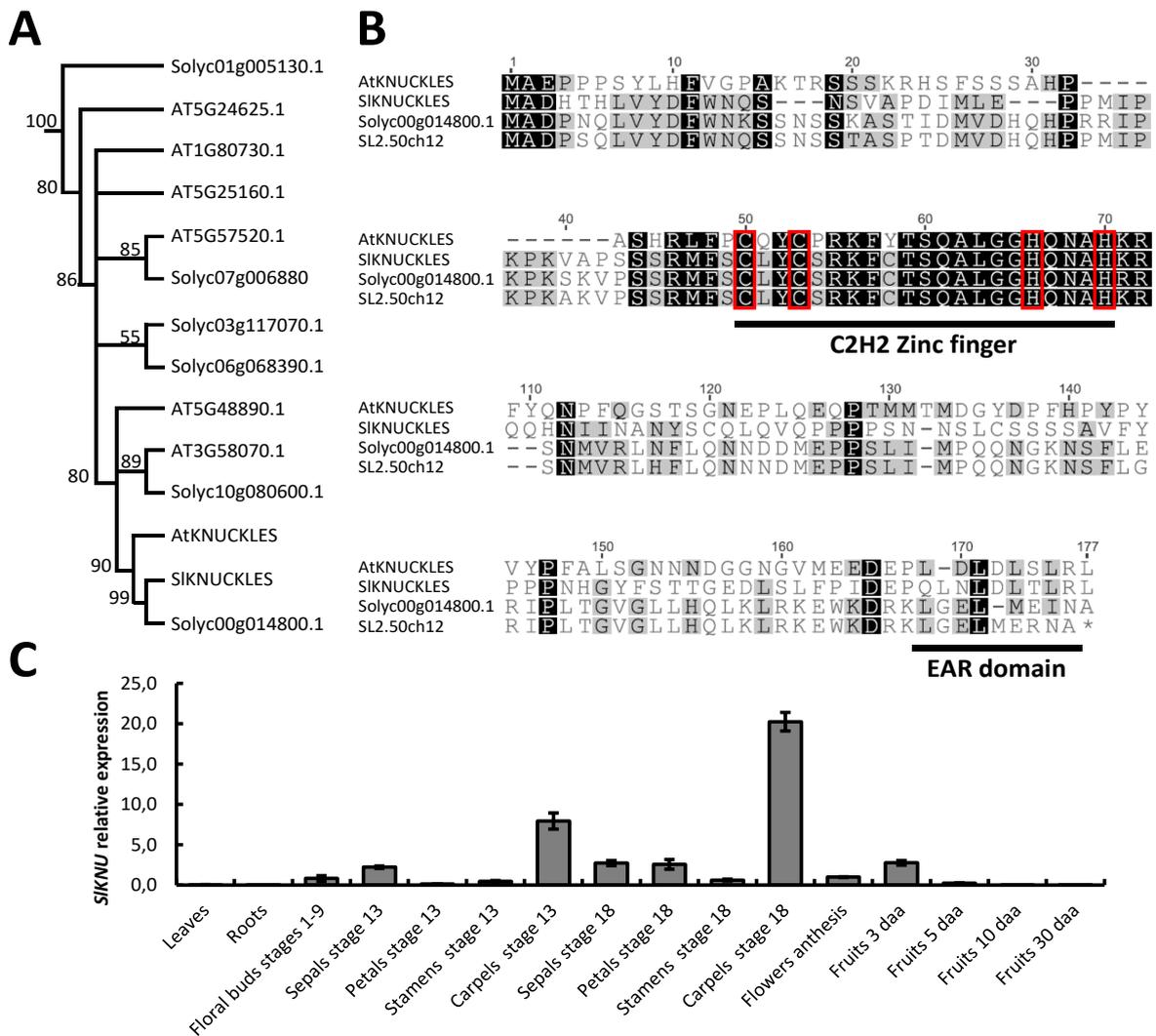


Figure 44: SIKNUCKLES phylogenetic and expression analyses.

(A) Neighbor-joining tree illustrating relationships between Arabidopsis and tomato KNUCKLES homologs. (B) Sequence comparison between KNUCKLES and the three closest sequences in tomato. Cysteine and Histidine residues of the C₂H₂ zinc finger domain and leucine residues of the EAR domain (Hiratsu *et al.*, 2002) are highlighted. (C) SIKNU expression analysis using quantitative real-time RT-PCR in different tissues and during floral and fruit development. daa : day after anthesis.

Only the third sequence localized on chromosome 2 fitted the minimal requirements to be considered as a potential KNU homolog, *i.e.* the presence of a C₂H₂ zinc finger and an EAR domain (**figure 44B**). The analysis of its expression pattern showed a high expression level during early floral development, consistent with the expression of *KNU* in *A. thaliana*, and therefore suggested as well a putative function during flower development (**figure 44C**). This sequence was then tentatively named *SIKNUCKLES* (*SIKNU*).

The overexpression of *SIKNU* using a constitutive promoter (*35S::SIKNU*) led to a loss of apical dominance, resulting in a dwarf and bushy phenotype, and in a reduction of the overall flower size (**figure 45A-B**). The severity of the phenotype was dependant on the level of overexpression in each lines (data not shown). Conversely, *35S::SIKNU-RNAi* loss-of-function lines did not display any vegetative phenotype but were strongly affected in flower development (**figure 45**). The number of petals, stamens, and carpels were significantly higher in these lines compared to WT (**figure 45B**), which indicates that the *SIKNU* function is required to control organ number during tomato flower development. These *35S::SIKNU-RNAi* lines produced fruits up to 8 carpels, in a similar way than *35S::IMA-RNAi* did (**figure 43i; figure 45C**).

We concluded from all these results that *SIKNU* is the true ortholog to *KNU*. Altogether, these results highlighted a general genetic network controlling FM termination that is conserved between *A. thaliana* and *S. lycopersicum*.

AGAMOUS physically interacts with the promoter of MIF2 and IMA and activates their expression during flower development.

To position *MIF2* and *IMA* within the genetic framework controlling FM termination, we next investigated their transcriptional regulation. Since both the biological function and expression pattern of *MIF2* and *IMA* are conserved, we hypothesized that their transcriptional regulation should be likewise and that conserved regulatory elements could well be identified within the promoters of the two genes.

Therefore we used the mVISTA software (<http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>) to perform the alignment of a ~2.8 kbp-long DNA sequence encompassing the 5' upstream gene- and coding sequence of *A. thaliana MIF2* with the corresponding DNA sequence of the tomato *IMA* locus. Within the 2385-bp sequence upstream of the translation start codon of *MIF2* and

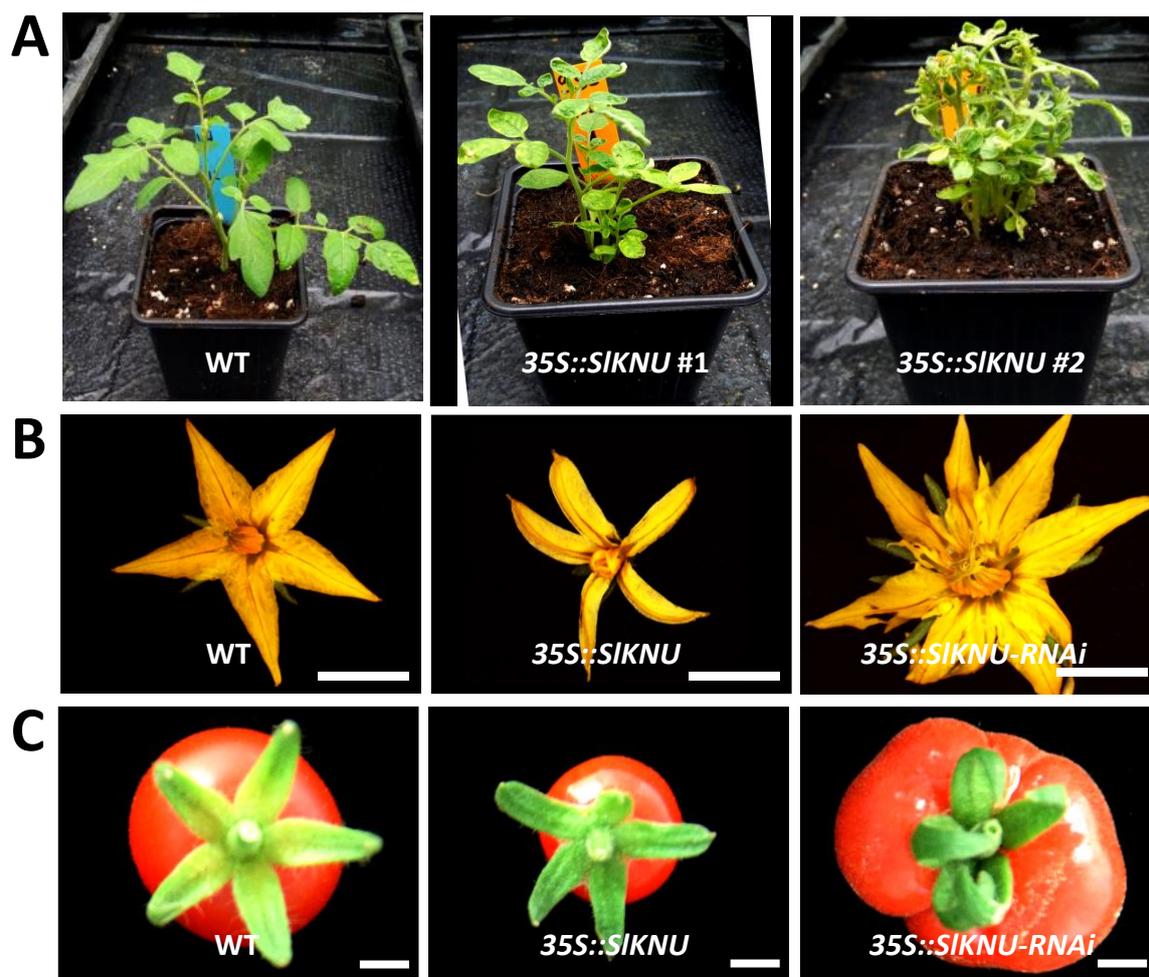


Figure 45: Vegetative, floral and fruit phenotypes of *SIKNU* gain- and loss-of-function lines.

(A) Vegetative phenotype of WT and two *35S::SIKNU* lines

(B) Floral phenotypes of WT, *35S::SIKNU* and *35S::SIKNU-RNAi* lines

(C) Fruit phenotypes of WT, *35S::SIKNU* and *35S::SIKNU-RNAi* lines

Bars, 5mm

IMA, five conserved DNA regions referred to as domain A to E were identified (**figure 46A**). In addition, the mVISTA software highlighted the two conserved domains referred to as domain Ia and Ib (**Windhövel et al., 2001**), defining the putative zinc finger motif within MIF proteins. The analysis was then completed by searching for transcription factor binding sites using the rVista and MatInspector softwares. According to the phenotypic alterations induced by the loss-of-function of *MIF2* in *Arabidopsis* and *IMA* in tomato, we focused on the identification of binding sites for transcription factors involved in carpel identity and FM determination. Binding sites for AG and AGAMOUS-LIKE (AG-L) proteins were found in the promoter sequences of both *MIF2* and *IMA* (**figure 46B**). Among these, AG, AGL-1 and AGL-3 binding sites, located at around 230 nucleotides upstream of the translation start codon, overlapped with the conserved B domain. A second AG binding site was identified at close proximity to the E domain in both promoter sequences (**figure 46B**). The presence of a CArG-box known to be bound by AG and AG-L proteins within conserved regulatory sequences, together with the known function of AG and AGL proteins in FM termination and carpel development, strongly suggested that these proteins could directly regulate *IMA/MIF2* expression during flower development.

Transcription factors such as AG are believed to act in a high order complex in which MADS-box domain proteins with specific function in organ identity determination are recruited through their interaction with more generic MADS-box proteins such as SEP3 (**Kaufmann et al., 2009; Pajoro et al., 2014**). Genome wide interaction of SEP3 to DNA has been extensively studied in different MADS-box mutant backgrounds allowing the identification of specific downstream targets (**Kaufmann et al., 2009; Pajoro et al., 2014**). We therefore made a survey of the published SEP3 Chip-Seq experiments in WT and *agamous* mutant background (**Kaufmann et al., 2009**). Interestingly, SEP3 has been reported to bind *MIF2* promoter in an AG-dependent manner (**Kaufmann et al., 2009**), suggesting that AG itself or its targets are promoting the binding of the MADS-box protein complex to *MIF2* promoter. To determine whether AG directly interacts with *MIF2* promoter, we tested the relevance of the putative AG binding site identified in the 5' upstream region of *MIF2* using Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) (**figure 46C**). Soluble AG proteins were first mixed with a specific oligonucleotide sequence, used as a positive control probe for AG fixation as already reported (**Riechmann et al., 1996**). A mobility shift was then observed

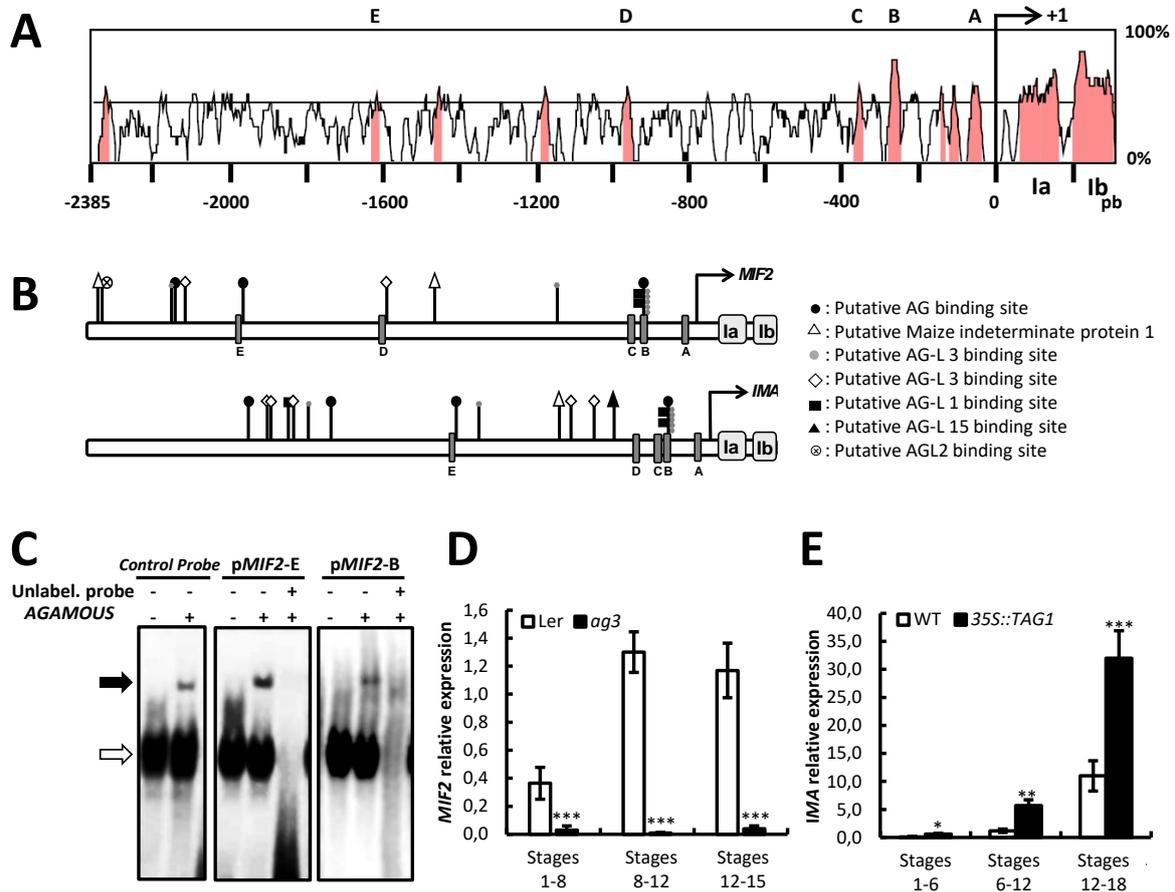


Figure 46: MIF2 and IMA expression is directly regulated by AG and TAG1 respectively

(A) mVISTA analysis of the *MIF2* promoter region, using parameters of 70% of identity and a 20pb calculating windows. Conserved DNA domains are highlighted in grey and referred to as A to E domains. The arrowhead indicates the transcription start site; la and lb refer to regions encoding the zinc-finger protein subdomains.

(B) rVISTA and MatInspector analysis of the *MIF2* and *IMA* promoter regions. The locations of putative transcription factor binding sites are indicated along the 2400 bases of the 5' upstream regions. Conserved DNA domains are shown in grey and named according to (A).

(C) *In vitro* binding of AG to specific oligonucleotides as shown by EMSA. The black arrow points at the mobility shift corresponding to AG binding to the probe; the white arrow reveals an unspecific binding of bacterial proteins to the probe. Unlabel. = Unlabeled: Control probe is a conserved CARG sequence.

(D) *MIF2* gene expression analysis in WT Ler and *ag3* floral buds at various stages of development, using quantitative real time RT-PCR.

(E) *IMA* expression level analysis in WT and *35S::TAG1* floral buds at various stages of development, using quantitative real time RT-PCR.

Error bars represent SD of three biological replicates and asterisks indicate significant differences from the control (WT) using two-tailed t-test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

which could not be obtained when the control probe was mixed in the presence of soluble proteins from cells that did not express AG (used as negative control protein cell extracts) **(figure 46C; left panel)**. We then tested two oligonucleotide sequences, designated as pMIF2-E and pMIF2-B respectively corresponding to the E and B conserved domains identified as putative AG binding sites. In the presence of AG proteins, a mobility shift with either pMIF2-E or pMIF2-B probe was obtained, similarly to that observed with the positive control probe **(figure 46C; central and right panels)**, thus indicating that AG binds to the two tested pMIF2 oligonucleotide sequences. The specificity of this interaction was ascertained as the EMSA signals disappeared when a 50-fold excess of unlabeled pMIF2-E or pMIF2-B probe was added in the assay.

To analyze whether this interaction has any relevance on the expression regulation of *MIF2* or *IMA* during flower development, we measured the relative abundance of *MIF2* and *IMA* transcripts in plants modified for the expression of *AG/TAG1* **(figure 46D and figure 47)**. The expression of *MIF2* was totally abolished in flower buds of the *ag3* mutant while that of *IMA* was upregulated in tomato *35S::TAG1* plants overexpressing TAG1, the tomato ortholog of AG **(Pnueli et al., 1994)**.

A *GUS* reporter gene assays was made in *35S::TAG1* (displaying fleshy sepals as described by Pnueli et al. 1994, **Figure 47B-C**) and WT background. In these lines the *GUS* expression driven by the promoter of *IMA* (*pIMA::GUS*) was greatly enhanced in both carpels and fruits **(figure 47E)** supporting previous results.

Altogether, these results strongly argue for the regulation of *MIF2* and *IMA* through a direct AG transactivation, indicating that *MIF2* and *IMA* act downstream of AG and TAG1 respectively, as to induce the meristem activity termination during floral development.

The mis-expression of MIF2/IMA and KNU/SIKNU affects the expression pattern of WUS and SIWUS respectively

The formation of new carpels in *Arabidopsis pPI::amiRNA-MIF2* and in tomato *35S::RNAi-IMA* loss-of-function flowers may be linked to an impairment of FM termination at the end of flower development, together with an increased availability in stem cells within the meristem, supposedly due to an ectopic *WUS* expression. We next investigated the temporal and spatial expression of *WUS* and its tomato ortholog *SIWUS* **(Reinhardt et al., 2003)** in *MIF2* and *IMA*

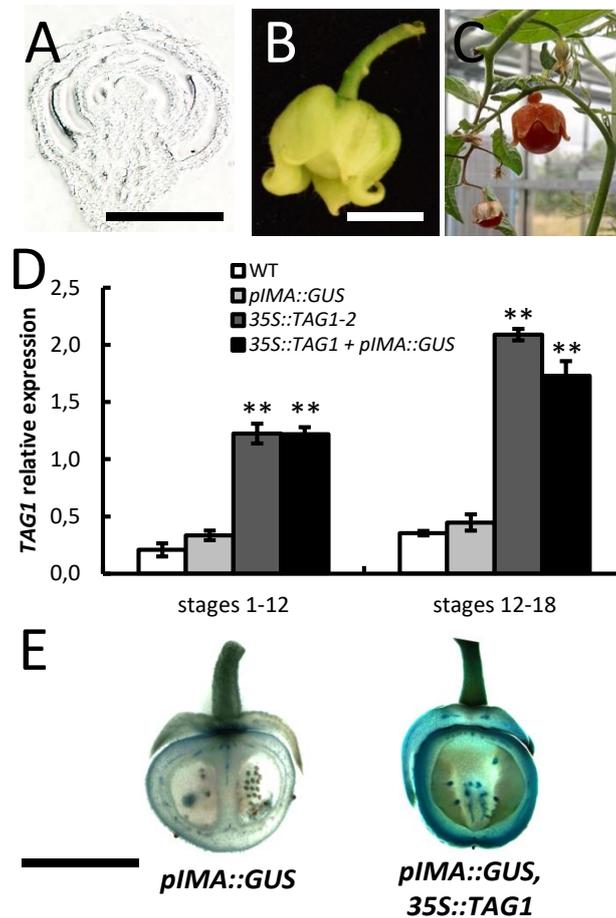


Figure 47: MIF2 and IMA gene expression is regulated by AG and TAG1 respectively

(A) *In situ* hybridization against *MIF2* mRNA in floral bud of *ag3* plant.

(B-C) Fruit phenotype of tomato *35S::TAG1* plants.

(D) *TAG1* gene expression analyses in *WT*, *pIMA::GUS*, *35S::TAG1-2* and *35S::TAG1, pIMA::GUS* lines

Error bars indicate SD, and asterisks indicate significant differences from the control (*WT*) using two-tailed t-test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

(E) *GUS* staining in fruit of *pIMA::GUS* and *pIMA::GUS, 35S::TAG1* lines

Bars, (A) 100 μ m ; (B) 5mm ; (E) 1cm.

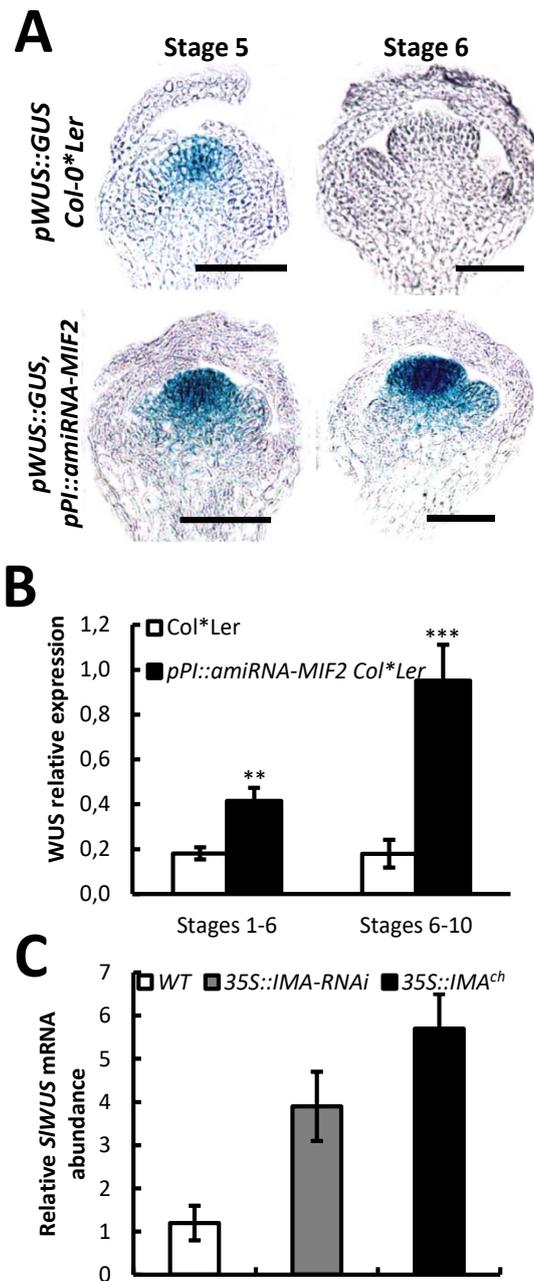


Figure 48: MIF2 and IMA repress *WUS* and *SIWUS* respectively during FM termination

(A-B) *WUS* expression analysis in WT (*Col***Ler*) and *MIF2* loss-of-function (*pPI::amiRNA-MIF2*) plants in various flower bud developmental stages, using *pWUS::GUS* staining in WT (*Col***Ler*) and *pPI::amiRNA-MIF2* (A) and using quantitative real time RT-PCR (B) Bars, 100 μ m.

(C) *SIWUS* expression analysis in WT, *IMA* loss-of-function (*35S::IMA-RNAi*) and dominant negative (*35S::IMA^{ch}*) plants, using RT-PCR.

Error bars represent SD of three biological replicates and asterisks indicate significant differences from the control (WT) using two-tailed t-test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

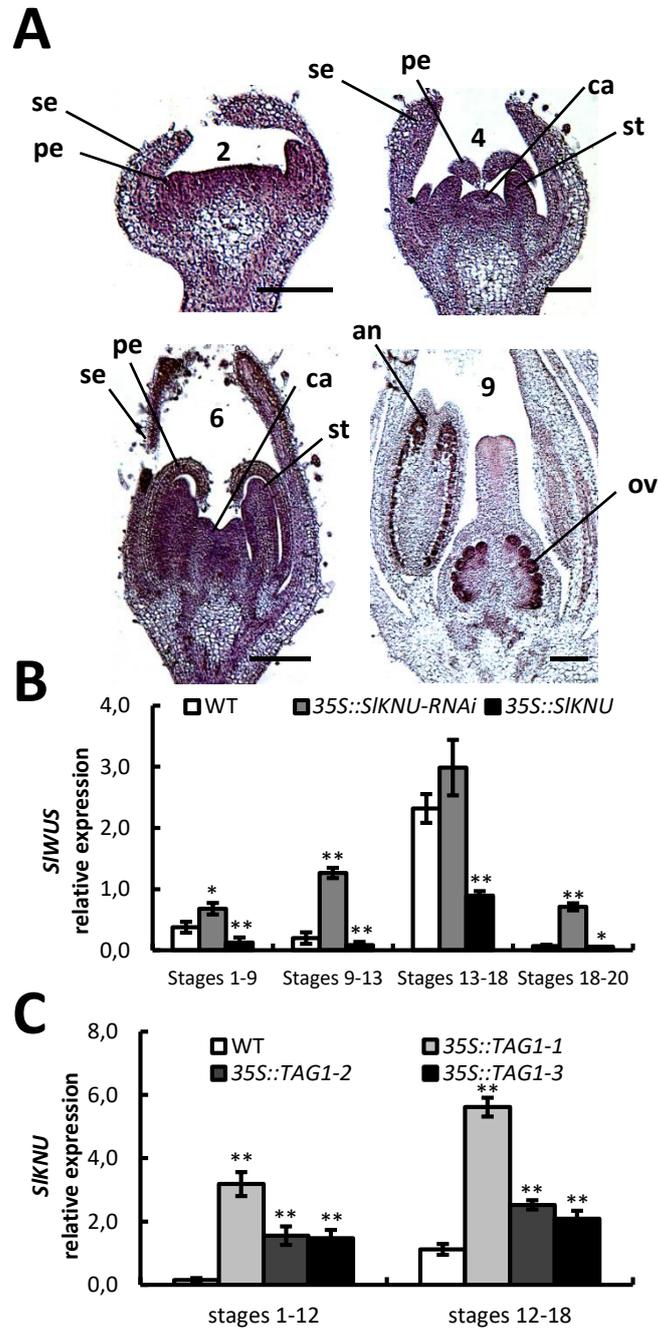


Figure 49: The *SIKNU* gene expression is promoted by *TAG1* to repress *SIWUS* gene expression in floral bud.

(A) *SIKNU* expression analysis in tomato developing flower buds by *in situ* hybridization. Bar, Stage 2 and 4 100 μ m ; Stage 6 and 9 : 250 μ m. se: sepal; pe: petal, st: stamen; c: carpel; ov: ovule; an: anther.

(B) *SIWUS* expression analysis in *35S::SIKNU-RNAi* and *35S::SIKNU* plants, compared to WT plants, using quantitative real time PCR.

(C) *SIKNU* expression analysis in *TAG1* overexpressor lines.

Error bars represent SD of three biological replicates and asterisks indicate significant differences from the control (WT) using two-tailed t-test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

loss-of-function plants respectively. Using *pWUS::GUS* plants reporting the endogenous expression pattern of *WUS* (Gross-Hardt *et al.*, 2002), *WUS* was shown to be expressed in flower buds at stage 5 within the organizing center of FM harboring the stem cells; at stage 6, its expression totally disappeared in this territory (figure 48A) as previously described (Mayer *et al.*, 1998). *WUS* expression was expected to start again in later floral developmental stages during anther and ovule development (Bäurle and Laux, 2005), which can explain the detection of *WUS* transcripts in these stages using real-time RT-qPCR (figure 48B). In the *pPI::amiRNA-MIF2* lines, a 2-fold higher expression for *WUS* was measured in early flower buds at stages 1-6, and around 5-fold at later stages 6-10 (figure 48B). These results were fully consistent with the persistence of a high GUS signal in flower buds at stage 6 (figure 48A). In tomato, since *SIWUS* expression was greatly induced in flower buds of *35S::IMA-RNAi* plants, but also in the *35S::IMA^{ch}* line when compared to that in WT (figure 48C), in accordance with previous results in *A. thaliana* and our previous study in tomato (Sicard *et al.*, 2008). Consistent with a strongest effect of the dominant negative IMA^{ch} protein, the abundance of *SIWUS* mRNA was higher in flower buds of *35S::IMA^{ch}* compared to that in *35S::IMA-RNAi*. These data thus indicated that *WUS* and *SIWUS* repression during floral development requires *MIF2* and *IMA* respectively, which leads to the termination of stem cell activity within the FM.

Prior to analyze if *SIKNU* may play a similar role than *KNU* in the repression of *WUS* we made a precise analysis of its expression during early flower development using *in situ* hybridization (figure 49A). The expression was detected in the first cell layers of FM, and next during the process of floral termination (stage 6), the *SIKNU* transcripts accumulated in carpel, stamen and petal primordia. At later floral developmental stages, the accumulation of the transcripts became progressively confined to specific cell types, within the developing anthers and the vascular bundles of the ovary and of the style, as well as in the ovules.

Next we examined whether *SIKNU* may play a similar role than *KNU* in the repression of *WUS* by analyzing *SIWUS* expression in *SIKNU* mis-expressing plants (figure 43N). In *35S::SIKNU* plants, the expression of *SIWUS* was lowered compared to that in WT plants, at all tested stages of flower development, thus indicating a persistent repression of *SIWUS* (figure 49B). Conversely in *35S::SIKNU-RNAi* plants, the expression of *SIWUS* was enhanced compared to that in WT, demonstrating that *SIKNU* is required for *SIWUS* repression (figure 49B). In addition the expression of *SIKNU* was greatly enhanced as a result of *TAG1* overexpression

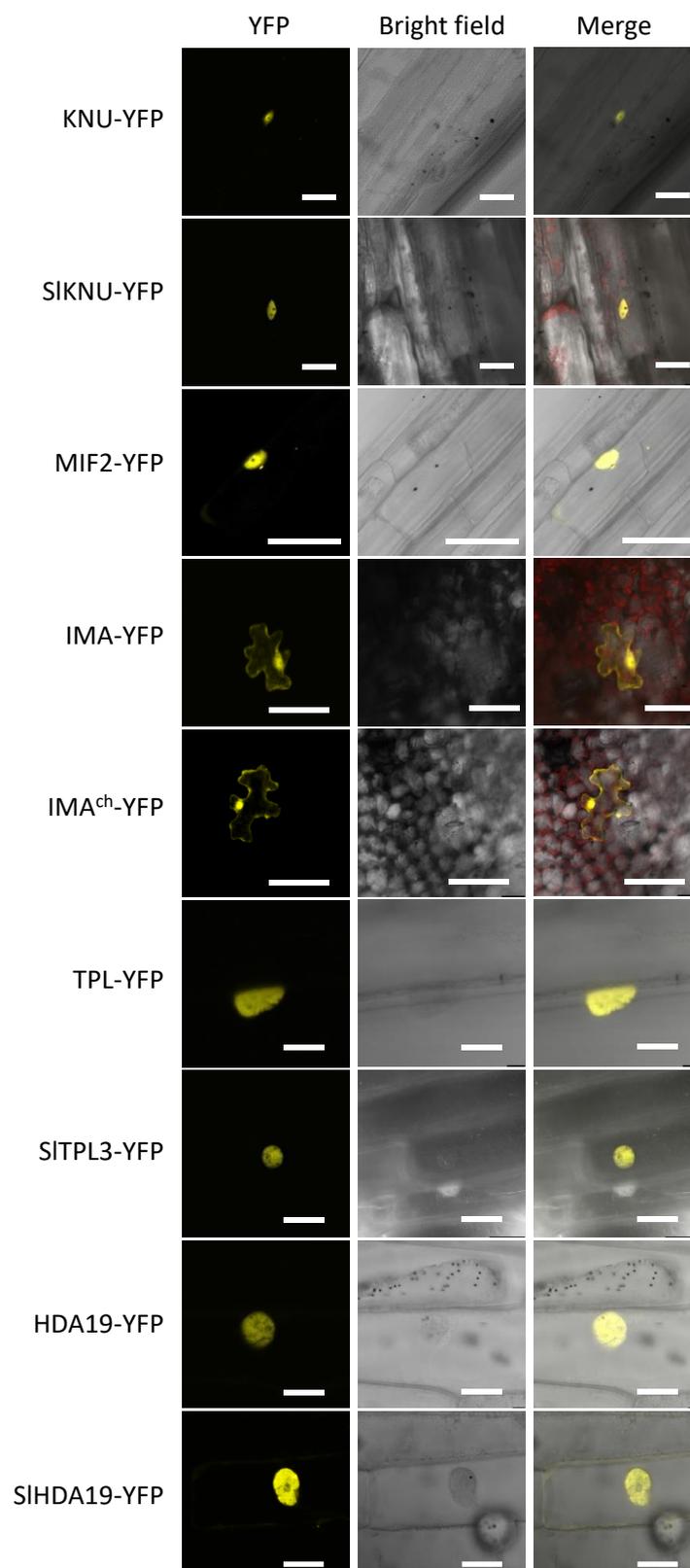


Figure 50: Subcellular localization of the different proteins studied.
 SIKNU-YFP, IMA-YFP and IMA^{ch}-YFP: Subcellular localizations in tomato epidermal cells. Bar, 25µm.
 MIF2-YFP and KNU-YFP: Subcellular localizations in *A. thaliana* root cells. Bar, 25µm.
 TPL-YFP, SITPL3-YFP, SIHDA19-YFP and HDA19-YFP: Subcellular localizations in onion epidermal cells Bar, 50µm.

(figure 49C) indicating the positive regulation of *SIKNU* by TAG1. Therefore, both *SIKNU/KNU* and *IMA/MIF2* are required to repress *WUS* expression during FM termination.

MIF2 and IMA contribute to recruit chromatin repressive complex by physically interacting with KNU and SIKNU respectively.

The above results indicated that AG/TAG1 activates directly the expression of *MIF2/IMA* as it does for *KNU/SIKNU* (Sun *et al.*, 2009). *MIF2* and *IMA* will in turn contribute to shut down the expression of the stem cell maintenance gene *WUS* in the center of the flower meristem. The similarity of phenotype caused by the loss-of-function of these two proteins suggests that they are involved in a common molecular regulatory mechanism.

The MIn zinc Finger (MIF) gene family encodes small proteins displaying only a non-canonical zinc finger domain involved in protein-protein interaction (Hu and Ma, 2006; Hong *et al.*, 2011). It has been suggested that MIF proteins could act as small interfering peptides/microProteins, inhibiting Zinc Finger-HomeoDomain protein function through the formation of inactive heterodimers (Hong *et al.*, 2011; Seo *et al.*, 2011; Staudt *et al.*, 2011; Eguen *et al.*, 2015). On the other hand, the *KNU* protein encodes a C₂H₂ zinc finger protein harboring an EAR transcriptional repressive motif at its C-terminus. As reviewed by Kagale and Rozwadowski (2011), recent discoveries of co-repressors interacting with EAR motifs, such as TOPLESS (TPL), led to the proposal of a model for EAR motif-mediated transcriptional repression in plants. In this model, EAR repressors suppress the expression of target genes through chromatin modification of regulatory regions by histone deacetylation. TPL was described to function in conjunction with HISTONE DEACETYLASE19 (HDA19) within a potential repression complex that will drive the epigenetic regulation of gene expression. However the exact composition of the repressive complex remains unclear. We therefore hypothesized that *KNU* could directly regulate *WUS* expression through the recruitment of a chromatin remodeling complex, and aimed at testing whether *MIF2* may contribute to the formation of this complex through its ability to interact with other proteins.

To test this hypothesis we first assayed the ability of *MIF2* and *IMA* to interact with *KNU* and *SIKNU* respectively, using BiFC experiments. While only *MIF2* and *IMA* were localized both in the cytoplasm and the nucleus, *KNU* and *SIKNU* were found to accumulate in the nucleus (figure 50). As revealed by the fluorescent signal resulting from the reconstruction of a

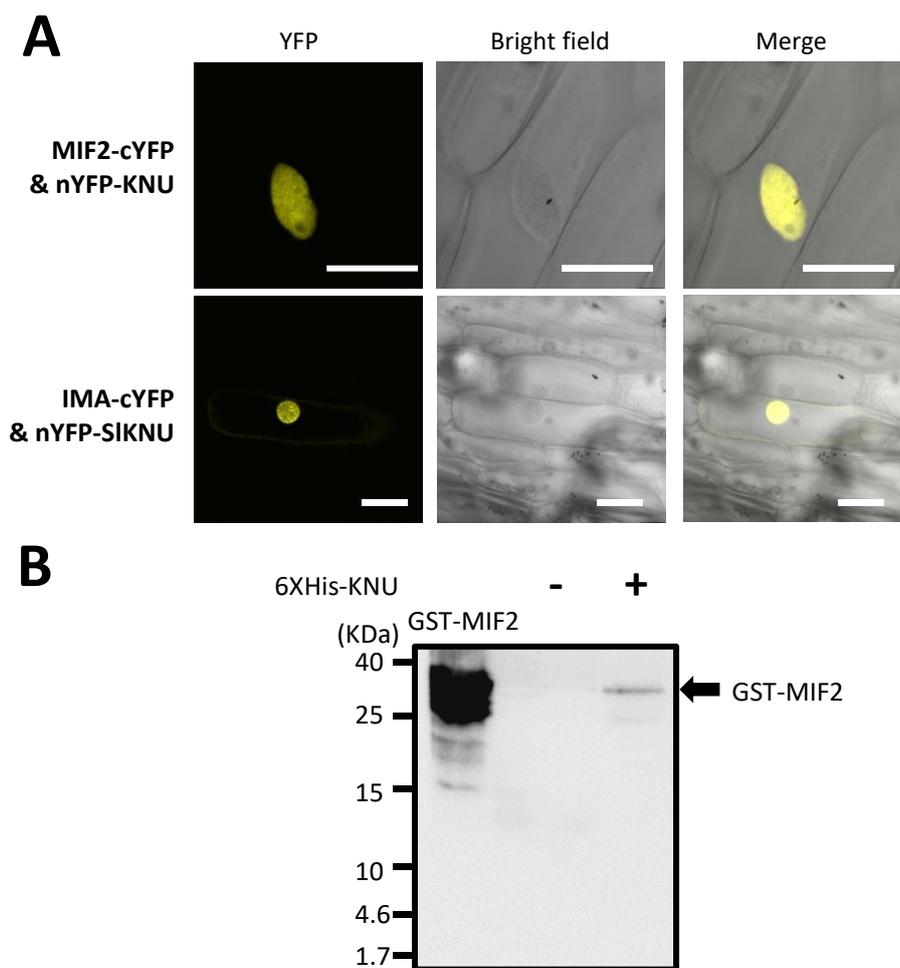


Figure 51: MIF2 and IMA interacts physically with KNU and SIKNU respectively

(A) BiFC analysis of the interaction between MIF2 and KNU, (upper panels) and IMA and SIKNU (lower panels) in onion epidermal cells.

(B) *In vitro* pull down of GST-MIF2 with 6XHis-KNU as bait bound on Ni-NTA resin. GST-MIF2 was detected using anti-GST antibody (Santa Cruz Biotechnology).

functional YFP, MIF2 and IMA were able to interact with KNU and SIKNU respectively (**figure 51A**). Interestingly, the BiFC signals associated to the MIF2-KNU and IMA-SIKNU interactions were both exclusively detected in the nucleus.

Moreover, using purified recombinant GST-MIF2 and 6XHis-KNU we made a pull-down assay confirming the physical interaction between the two protein *in vitro* (**figure 51B**).

Using BiFC assay with truncated version of KNU and SIKNU we could then demonstrate that the MIF2-KNU and IMA-SIKNU interactions is conserved despite the deletion of the EAR domain present in the C-terminal part of KNU and SIKNU (**figure 52**). Hence these interactions were likely occurring via the presence of the C₂H₂ zinc finger domain or another part of the KNU and SIKNU N-termini. Taken together, these data strongly indicate that these two proteins directly interact with each other *in vivo* and *in vitro*, suggesting they might form heterodimers in playing their roles as regulator of *WUS* expression.

MIF2, KNU and TPL binds WUS locus and its repression is linked to a deacetylation process

In accordance with the idea that the repressive activity of KNU may be mediated through its interaction with a transcriptional co-repressor such as TPL we tested whether KNU is able to interact with TPL in BiFC experiments, but we could not observe any fluorescent signal suggesting that this interaction is too weak to be observed by BiFC, or that it requires the presence of another protein to stabilize the interaction. Interestingly, a microprotein miP1a/b has been previously described as an adaptor protein between a zinc finger transcription factor (CONSTANS) and a TOPLESS-related protein (**Graeff et al., 2016**). We made use of these new data to wonder whether MIF proteins could act as adaptor proteins in such interactions, and next evaluated the potential interaction between KNU and TPL in the presence of MIF2. A BiFC YFP-fluorescent signal indicating the formation of a KNU-TPL or SIKNU-SITPL3 complex was solely observed in the presence of MIF2 or IMA, here fused to RFP as a second reporter protein in the assay (**figure 53A**). In addition, the BiFC signal was localized in small subnuclear speckles exhibiting RFP signal suggesting the co-localization of MIF2-RFP with the KNU-TPL interacting proteins (and IMA-RFP with SIKNU-SITPL3 as well), probably in a multipartite complex. We concluded from these data that MIF2 which lacks any DNA-binding motif, could acts as an

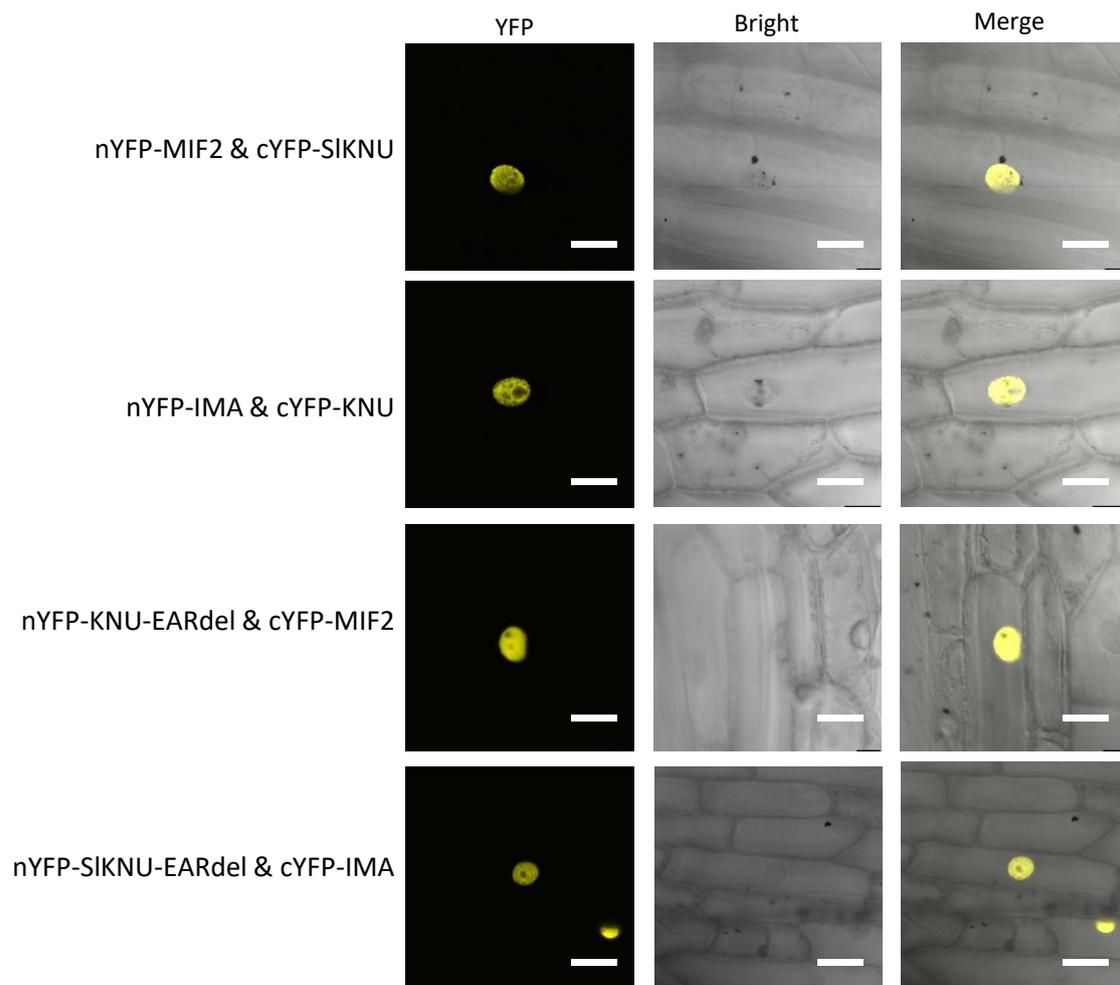


Figure 52: *In cellulo* interactions of MIF2 and IMA with KNU and SIKNU are conserved between the two species and does not involve the EAR domain.

BiFC analysis of the interaction in onion epidermal cells.
Bars, 50 μ m.

adaptor/stabilizer protein to recruit the co-repressor protein TPL and allows the bridging with the transcription factor KNU.

To examine whether MIF2, KNU and TPL, as part of this complex, bind directly to the *WUS* locus, we performed CHIP analyses using transgenic Arabidopsis plants over-expressing MIF2-KNU- or TPL-tagged proteins. Commercial antibodies directed against the 3HA- protein tag were used to immunoprecipitate MIF2-, KNU- or TPL-chromatin complexes. Four DNA sequences spread along the *WUS* locus (previously described by Liu *et al.*, 2011) were used for the identification of potential chromatin-immunoprecipitated fragments (**figure 53B**). Among the four targeted sequences, the specific amplification after chromatin enrichment of the P4 sequence revealed that MIF2, KNU and TPL are all three able to bind to this sequence within the *WUS* locus (**figure 53B**). Interestingly, this particular sequence also corresponds to a binding site targeted by AG in the *WUS* locus (Liu *et al.* 2011). Interestingly, P2 and P6 were immunoprecipitated in the presence of TPL-tagged, indicating that TPL but also MIF2 for the P6, may bind to other parts inside the *WUS* locus, most probably with other unknown protein partners.

As outlined above, TPL mediates gene repression through interaction with with an HISTONE DEACETYLASE (HDA)-like HDA19 protein, suggesting that TPL-mediated regulation of gene expression involves a deacetylation mechanism (Kagale and Rozwadowski, 2011). BiFC experiments with Arabidopsis or tomato TPL and HDA19 proteins did confirm this interaction (**figure 54**). Interestingly we could demonstrate that MIF2 and IMA are also able to interact with HDA19 and SIHDA1, the tomato ortholog of AtHDA19 (Zhao *et al.*, 2015), respectively, arguing for the hypothesis of an adaptor protein function enabling the formation of a chromatin remodeling complex.

To test the hypothesis that the repression of *WUS* by a KNU-MIF2-TPL-HDA complex requires histone deacetylation, the effects on *WUS* expression of trichostatin A (TSA), a specific inhibitor of histone deacetylase activity, was evaluated in Arabidopsis Col-0 WT plants and *35S::MIF2* overexpressing plants. A TSA treatment led to a strong increase in *WUS* expression both in WT, and more importantly, partially rescued *WUS* expression to WT level in MIF2 overexpressing plants (**figure 53C**), thus indicating that the *WUS* repression requires a deacetylation mechanism, putatively involving MIF2. The high level of *WUS* expression in the *hda19* mutant strongly supported this hypothesis. To examine whether this increased

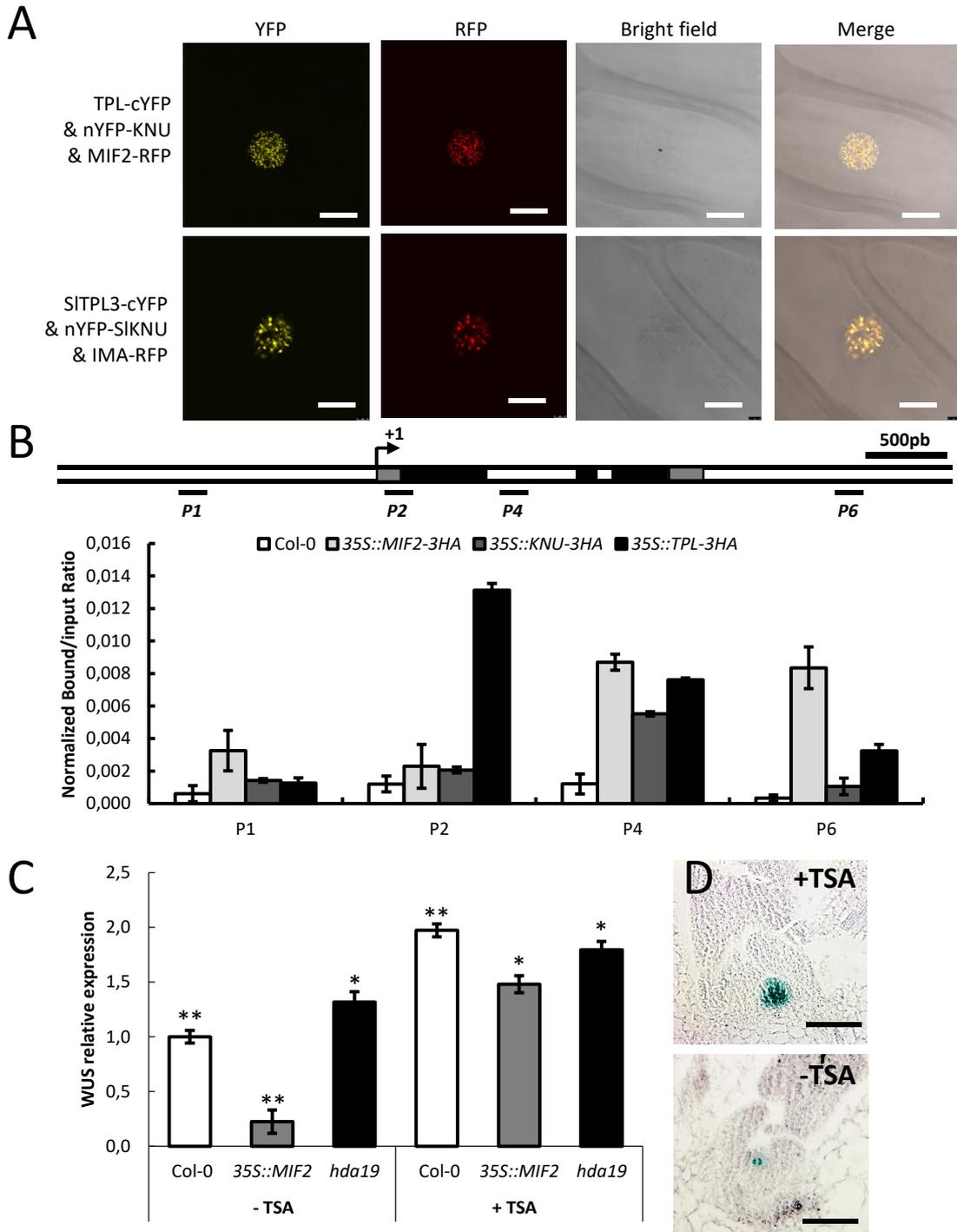


Figure 53 : Transcriptional repression of *WUS* gene involves a ternary MIF2-KNU-TPL complex in connection with a deacetylation process

(A) BiFC analysis of the interactions between KNU and TPL (upper panel), SIKNU and SITPL3 (lower panel) in the presence of MIF2 and IMA respectively, in onion epidermal cells.

(B) ChIP assay at the *WUS* locus using HA-antibodies in Col-0, *35S::MIF2-3HA*, *35S::KNU-3HA*, *35S::TPL-3HA* plants. The Y-axis shows relative enrichment using IgG as a control. Error bars represent SD of three PCR replicates.

The locations in the *WUS* locus of the primers used for the analysis are indicated; 5' and 3' UTR sequence are in grey, exons in black and introns or intergenic sequences in white.

(C) *WUS* gene expression analysis in Col-0, *35S::MIF2* and *hda19* plants treated or not with trichostatin A, using quantitative real-time RT-PCR.

Error bars represent SD of three biological replicates and asterisks indicate significant differences from the control (Col-0) using two-tailed t-test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

(D) *WUS* gene expression analysis followed by *GUS* staining of *pWUS::GUS* plants treated (upper panel) or not (lower panel) with TSA.

Bars, 10 μ m.

expression level is associated with an extended *WUS* expression pattern, the *pWUS::GUS* reporter line was treated with or without TSA before GUS staining. After the TSA treatment, the GUS signal was observed in an enlarged zone of the shoot apical meristem, compared to that obtained in TSA-untreated plants (**figure 53D**), thus indicating a de-repression of *WUS* consecutive to the inhibition of HDA activity. These data confirmed that the repression of *WUS* mediated by *MIF2* in *Arabidopsis* requires a histone deacetylation-dependent chromatin remodeling mechanism.

Consistent with the idea that MIF2/IMA is necessary for KNU/SIKNU to recruit chromatin repressor complexes, we observed that IMA^{ch}, was unable to interact with SIKNU while it conserved its ability to interact with the full length IMA protein (**figure 52**). This observation is in accordance with the similar “fruit-inside-fruit” phenotype as observed in both *35S::IMA^{ch}* plants and the *knu* mutant in *Arabidopsis*. Thus the overexpression of IMA^{ch} is likely to sequester the endogenous IMA protein preventing its adaptor function required by KNU for recruiting the chromatin remodeling proteins.

Conclusion

We here provide the first demonstration that MIF2 and IMA as representative members of the MIF protein family, function as regulatory elements within the AG-WUS pathway controlling FM termination in both *A. thaliana* and tomato species. Furthermore, we demonstrated the required involvement of MIF2 and IMA as adaptor microproteins engaging respectively KNU and SIKNU in an oligomeric chromatin remodeling complex that involves TPL and HDA19 to repress *WUS* in a deacetylation-dependent manner. Our present work confirmed the existence of an adaptor protein to facilitate the association between TPL and HDA19, as proposed by Kagale and Rozwadowski (2011). This protein has been herein identified as MIF2 in *Arabidopsis* and IMA in tomato. Mini zinc Finger proteins thus constitute new and conserved components of the floral termination pathway with a key function in the determination of carpel number, and hence of fruit locule number, an important agronomic trait controlling fruit size and yield.

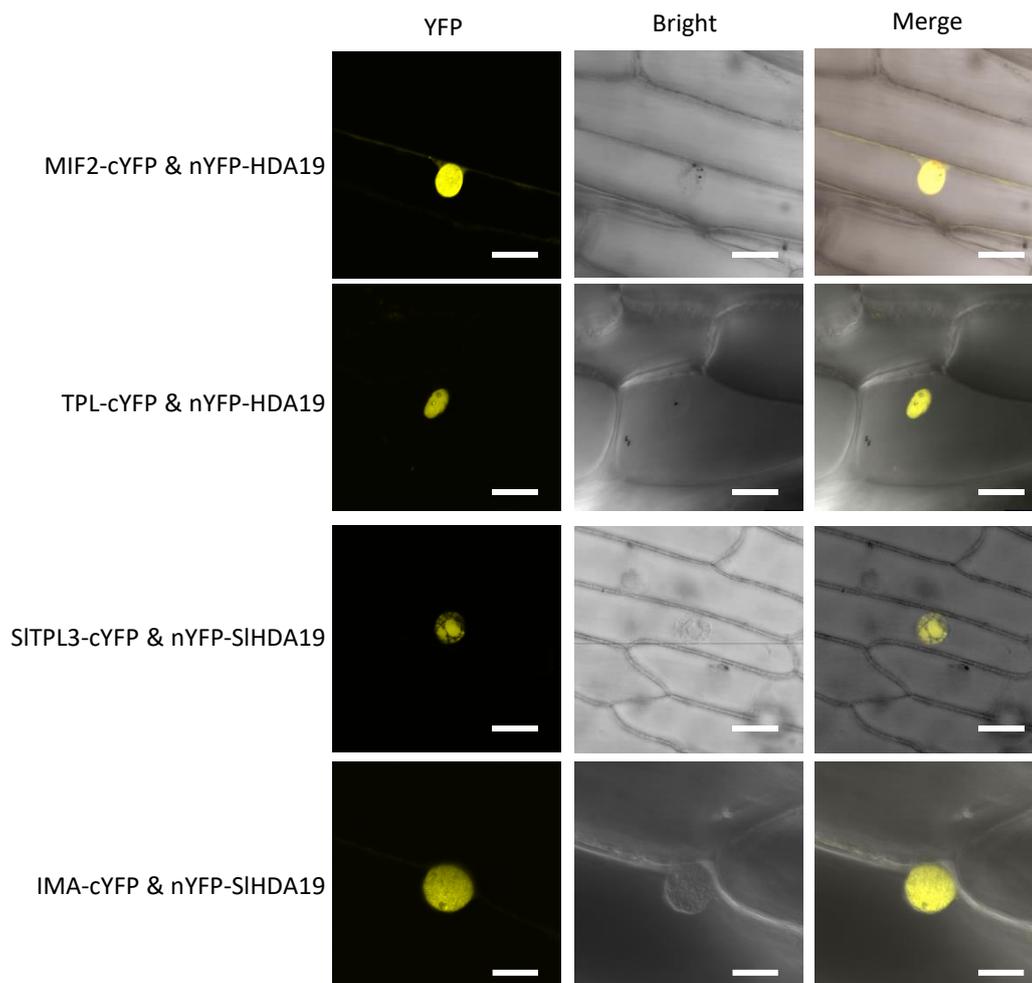


Figure 54: TPL, MIF2, SITPL3 and IMA physically interact *in cellulo* with HDA19 and SIHDA19 respectively.

BiFC analysis of the interactions in onion epidermal cells.

Bars, 50µm.

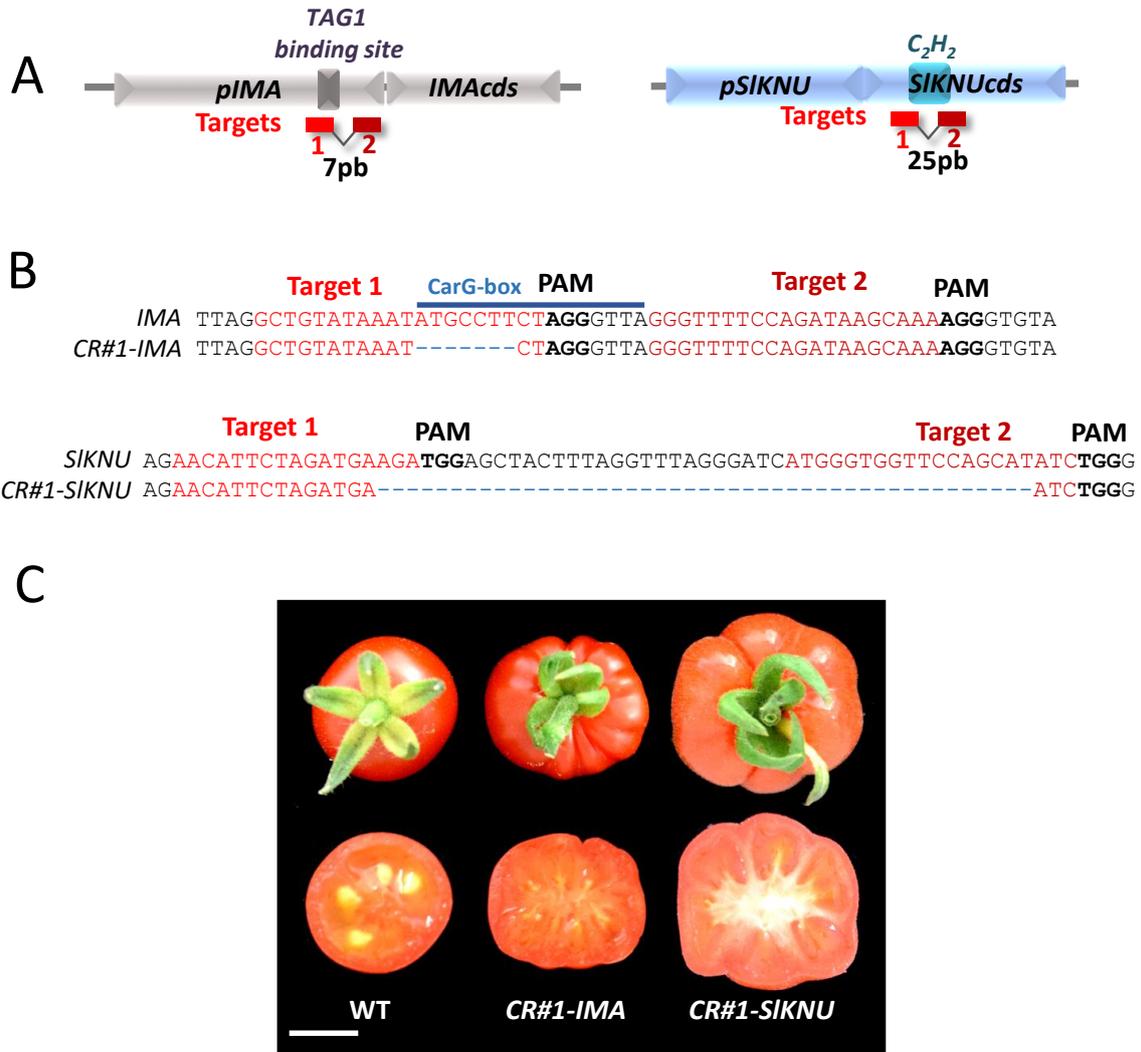


Figure 55: CRISPR/Cas9-engineered mutations in *IMA* promoter and *SIKNU* genes result in multicarpellar fruits.

(A) Scheme illustrating two sgRNAs (red rectangles) targeting the TAG1 binding site (CarG-box) in *IMA* promoter and the C_2H_2 in *SIKNU* coding sequence.

(B) WT, *CR1#-IMA* and *CR1#-SIKNU* alleles sequences identified from two homozygous T0 plants. Blue dashed lines indicate deletions. Red font highlights sgRNA targets, and bold nucleotides indicate protospacer-adjacent motif (PAM) sequences.

(C) Fruits from WT, *CR1#IMA* and *CR1#SIKNU*. Both mutant shows multicarpellar fruit phenotype.

Bar, 1cm.

Complementary results

Validation of IMA and SIKNU function and regulation using CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis

I made use of the double-guided strategy CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis in order to investigate the effect of a loss-of-function in *MIF2*, *IMA* and *SIKNU*, but also to test the consequences of deleting important regulatory domains within the promoter of *IMA*. It is noteworthy that *IMA* or *MIF2* knock-out mutants had never been isolated so far whatever the mutant collection investigated either in Tomato or *A. thaliana*, suggesting a potential lethality of such mutations. First, I designed two single guide RNA (sgRNA) targeting the *IMA* and *MIF2* coding sequences, but surprisingly we did not obtain any plants mutated, even at the heterozygous state in both species despite a huge number of transformants expressing the *Cas9*. These results could be linked to an inaccessibility of the locus to the designed sgRNA and therefore the generation of new sgRNAs is required to test their mutagenesis efficiency. I also designed two sgRNA surrounding the already mentioned CarG sequence in the *IMA* promoter (**figure 55A**), in order to abolish the activation of *IMA* expression by TAG1. Some T0 mutants with deletions of the CarG box have been obtained using this method as revealed by DNA extraction, PCR and DNA sequencing using leaf tissues. Fruits from these homozygous T0 mutated plants displayed a multicarpellar phenotype suggesting an alteration of *IMA* expression leading to the supposed maintenance of *WUS* gene expression (**figure 55C**). Expression analyses of *IMA* needs to be done to evaluate the effect of the deletion on the *IMA* expression pattern and level.

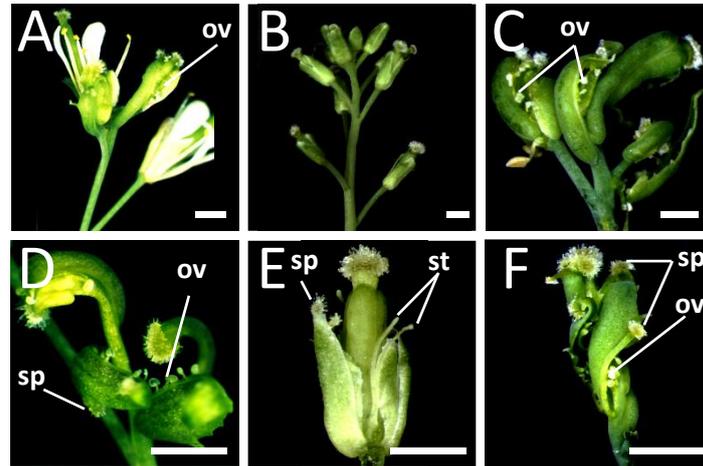
Using two sgRNA against the *SIKNU* coding sequence (**figure 55A**), I obtained important deletions in T0 plants (**figure 55B**). Homozygous T0 lines displayed the expected phenotype with multicarpellar fruits (**figure 55C**). Further work in T1 plants needs now to be done to validate these results and to avoid any chimerism due to different mutations in the T0 plants. However these results validate the phenotype observed in loss-of-function due to RNA interference.

MIF2, a little protein involved in pathways

Effect of MIF2 over-expression on B function gene

MIF2 expression territories suggest not only a role in the floral termination process but also in other steps of floral development. Moreover, the *MIF2* overexpression induces pleiotropic abnormal phenotype both in the vegetative and reproductive parts (**Hu and Ma, 2008; Leblond, 2011**). In severe *MIF2* overexpressing lines, sepals were converted into carpelloid structures; ovules developed on the internal parts of these converted sepals and stigmata structures arose in their apical parts (**figure 56A and D**). It is noteworthy that these profound flower alterations were mainly observed after two to three weeks of flowering, and flowers of the terminal inflorescence were the most affected (**figure 56A and D**). These observations suggest that *MIF2* may be implicated in the acquisition of carpel identity during flower development and are consistent with the over-production of ovules in tomato *IMA* overexpressing lines (**Sicard et al., 2008**). In *pPI::amiRNA-MIF2* loss-of-function lines, a strong alteration of flower development was observed (**figure 56B-C and E-F**), characterized by an alteration of stamen development with homeotic conversion of the anther into carpelloid structure or complete absence of anthers (**figure 56B-C and E-F**). Flowers of the terminal inflorescences were also the most affected with carpelloid structures replacing almost all the floral organs (**figure 56C and F**). Moreover, in some *pPI::amiRNA-MIF2* loss of function lines all the flowers were altered with a complete absence of petals in the second whorl and filamentous carpelloid stamen (**figure 56B and E**)

I next investigated the expression level of *MIF2* during floral development and in these carpelloid structures in *MIF2* gain- and loss-of-function plants. The floral phenotype observed in *35S::MIF2* lines was found in tissues with the highest *MIF2* expression level (**figure 56G**). It was unexpected to find that the similar phenotype obtained in *pPI::amiRNA-MIF2* lines was correlated with a very low level of *MIF2* expression (**figure 56G**). Because this phenotype was not observed in *pPI::GUS* transgenic lines and was common in *MIF2* gain- and loss-of-function lines, it could not be due to an alteration of B-function genes linked to the transgenic *PISTILLATA* promoter insertion in the genome. This phenotype is reminiscent to the *ap3-3* phenotype and these homeotic conversions of sepals or stamens into carpelloid structures



G Col*Ler *pPI::amiRNA-MIF2 Col*Ler* *35S::MIF2 Col-0*Ler*

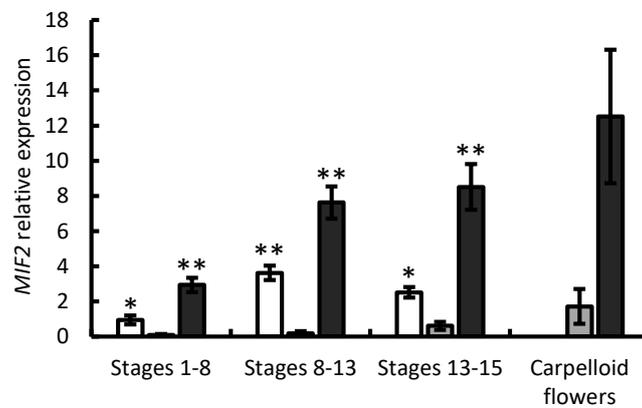


Figure 56: Floral defects of MIF2 overexpressing and loss-of-function lines.

(A-F) *35S::MIF2* (A and D) and *pPI::amiRNA-MIF2* (B-C and E-F) inflorescence and flower phenotypes.

Bars, 3mm.

ov : ovule, sp : stigmatic papillae, st : stamen.

(G) *MIF2* gene expression analysis in *35S::MIF2* and *pPI::amiRNA-MIF2* plants, compared to WT plants using quantitative real-time PCR.

Error bars indicate SD of three biological replicates, and asterisks indicate significant differences from the control (Col-0 or Col-0xLer) using two-tailed t-test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

suggest an alteration of the expression of B function genes such as *AP3* and *PI*. In order to compare the expression territories of *PI* in wild-type and *35S::MIF2* lines, I first analyzed the *pPI::GUS* and *35S::MIF2; pPI::GUS* reporter lines using GUS staining method (**figure 57**). The comparison of the GUS expression in these lines revealed that in *35S::MIF2; pPI::GUS* lines, GUS staining intensity was strongly reduced in young floral buds (**figure 57A-C and G-H**) and later on in petals and stamens (**figure 57E-F**) compared to *pPI::GUS* lines. I also performed real-time quantitative PCR on cDNA from buds, flowers and carpelloid structures of both *MIF2* overexpressing and loss-of-function lines to analyze the expression level of *AP3* and *PI* genes (**figure 57I**). In both *MIF2* gain- and loss-of-function plants, *AP3* and *PI* expression levels were also strongly reduced confirming the link between the observed phenotypes and the decrease of B-function gene expressions.

Until now, no genetic relationship was made between *MIF2* and B function genes. As a repressor of *WUS* expression, *MIF2* could be linked to an increase expression level of *AG* explaining the replacement of the different whorls by carpelloid structures, but the repression of *AP3/PI* gene expressions could not be due to this mechanism. One possible explanation came from the interaction between *MIF2* and the *CSN5* signalosome subunit. As demonstrated by Leblond *et al.* (unpublished results), *MIF2* is involved in the control of *CSN5* activity, which is necessary for floral development through its activity in the signalosome as observed in *csn5*, *csn6* and *csn1* mutants which display alterations of floral development linked to a defect in SCF^{UFO}-mediated degradation of *AP3* repressor (**Serino *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003**). In these mutants, *AP3* expression is strongly reduced. These results are reminiscent to our results concerning *MIF2* gain- and loss-of-function transgenic lines suggesting that *MIF2* alters *AP3/PI* expressions through the modification of the signalosome function. However, this hypothesis should be verified by the molecular and phenotypic analyses of plants in which the expressions of a *CSN* subunit and *MIF2* genes are affected. This study could be completed by the analyses of *MIF2* gain- and loss-of-function transgenic plants in which the expression *CSN* subunit gene is conditionally regulated. Such experiments should demonstrate that *MIF2* acts upstream COP-signalosome activity.

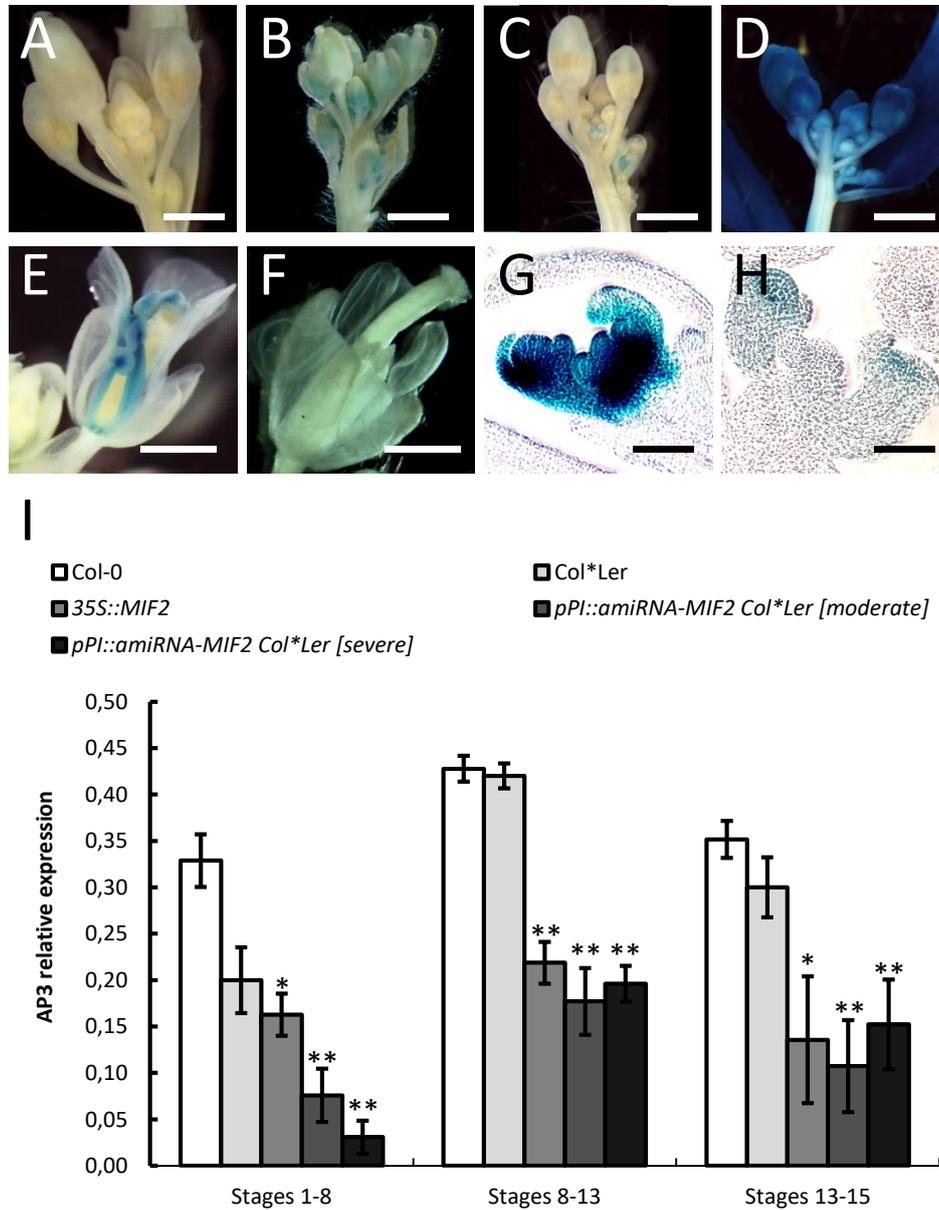


Figure 57: AP3 and PISTILLATA expression is altered in MIF2 gain- and loss-of-function plants.

(A-H) *GUS* staining in inflorescence, flower and floral meristem of Col-0 (A) *pPI::GUS* (B, E and G), *pPI::GUS;35S::MIF2* (C, F and H) and *35S::GUS* (D).

Bars, (A-F) 1mm, (G-H) 100µm.

(I) *AP3* gene expression analysis in *35S::MIF2* and *pPI::amiRNA-MIF2* plants, compared to the corresponding WT plants (Col-0 and Col-0*Ler respectively), using quantitative real-time PCR. Error bars indicate SD of three biological replicates, and asterisks indicate significant differences from the control (Col-0 or Col-0xLer) using two-tailed t-test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

Another hypothesis is possible, stating that the transcriptional repressor SUP is involved. SUP gene play a role in stamen-carpel boundary specification, flower meristem termination and B function regulation. SUP protein also displays the same canonical C₂H₂ zinc finger as KNU (**Breuil-Broyer et al., 2016**). To determine if SUP and MIF2 interact together, I made use of BiFC and I was able to show that MIF2 physically interacts with SUP in the nucleus (**figure 58**). To see if, alike KNU, MIF2 is involved in TPL recruitment to form a complex with SUP, I tested the ability of SUP to interact with TPL in the presence or absence of MIF2. However I was not able to demonstrate any interactions in transitory transformed cells. It is possible that SUP interacts with other members of the TPL family or requires another partner. Another potential interacting co-factor of SUP may be the Sin3A Associated Protein (SAP18) (**Kagale and Rozwadowski, 2011**). In fact it was demonstrated that as TPL, SAP18 is able to interact with EAR-domain protein and with HDA19, creating a link between the HDAC complex and transcriptional repressors that binds to specific chromatin regions (**Liu et al., 2009**). Moreover, it has been shown that SAP18 is involved in the transcriptional regulation of *SEP3* by AGL24 and SOC1, and the floral defect of *svp-41 amiR-sap18* lines is very similar to the alteration observed with *MIF2* misexpression, both linked to misregulation of class B genes (**Liu et al., 2009**). Using BiFC, I was able to show that SUP physically interacts with SAP18 in the nucleus (**figure 58**). This result is a first step to explain how SUP transcriptionally represses its target but further work needs to be done to find the link between MIF2, SUP, SAP18 and class B gene regulation. These results give rise to the hypothesis that MIF2 may play a role in SUP regulation as for KNU, thus explaining the alteration of class B gene expression in *MIF2* loss-of-function.

The similar phenotype observed in *MIF2* gain and loss-of-function is still such a mystery. One possible explanation is that MIF2 is involved in *AP3/PI* expression inhibition, explaining the phenotype of *35S::MIF2* lines and that the *pPI::amiRNA-MIF2* transgene induces side effects leading the the downregulation of *AP3/PI*.

IMA/MIF2 is involved in gibberelin regulation

MIF2 over-expressing lines display several phenotypes corresponding to an alteration of gibberellin synthesis or response to gibberellin. Their rosette leaves are smaller than in wild-type plants but also twisted, curved and darker green due to an increase level of chlorophyll

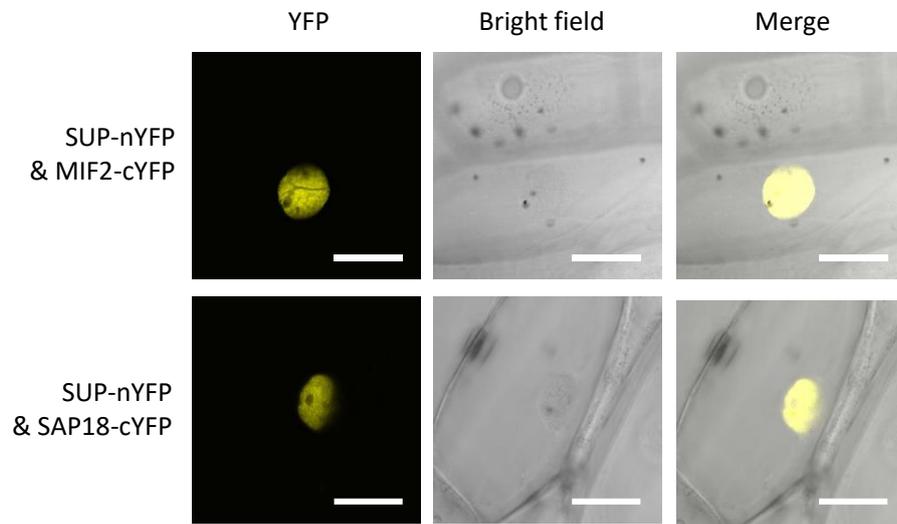


Figure 58 : MIF2 physically interacts with the C₂H₂ protein SUP and SUP interacts with SAP18.

BiFC analyses of MIF2 & SUP and SUP & SAP18 physical interaction in onion epidermal cells
Bars, 50µm.

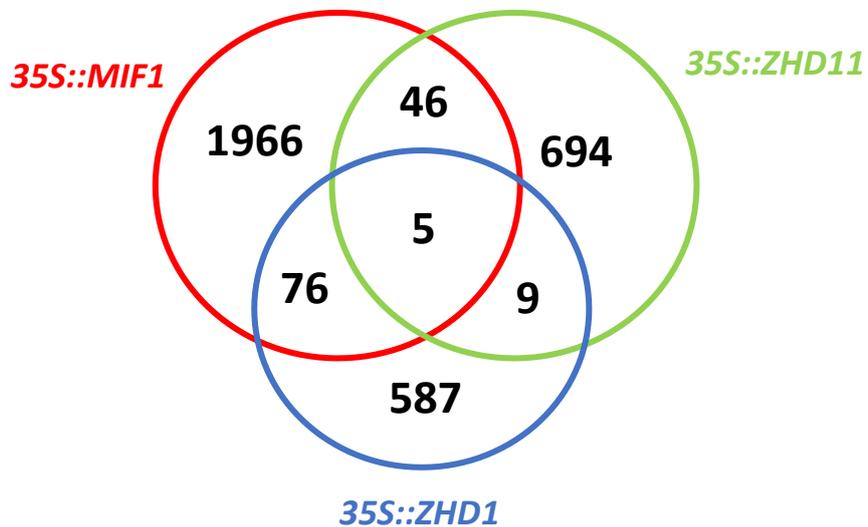


Figure 59: Venn diagram showing overlapping dysregulated genes between 35S::MIF1, 35S::ZHD11 and 35S::ZHD1 seedlings.

From data of Hu *et al.* 2006 concerning 35S::MIF1 ; Bueso *et al.* 2014 concerning 35S::ZHD1 and Tran *et al.* 2006 concerning 35S::ZHD11.

(Leblond-Castaing, 2007), associated with an increased expression levels of photosynthetic genes such as *LHCB1B1* and *LHCB2.2*.

In 2006, Hu *et al.* reported that *MIF1* overexpressing lines do not respond to GA₃ and are hypersensitive to the gibberellin synthesis inhibitor paclobutrazol suggesting a resistance of *35S::MIF1* line to GA. These results were consistent with gene expression analyses revealing an increased expression level of *RGL1*, *RGL2* and *RGL3* DELLA genes, a decrease in gibberellin-responsive *GASA* gene expression, but also of two *GA20-oxidase* genes in the *MIF1* overexpressing line, indicating an increased synthesis of GA. Despite this apparent resistance to GA, *35S::MIF1* overexpressing lines developed more axillary inflorescences upon GA treatment suggesting that the responses is different in seedlings and in adult plants. Moreover in 2011, Hu *et al.* demonstrated that GAs inhibit ectopic meristem formation in *35S::MIF1* and *35S::MIF3* plants.

To compare the effect of *MIF1* and *MIF2* overexpression, J. Leblond-Castaing analyzed *MIF2*-overexpressing line responses to GA and showed that *MIF2* overexpressor plantlets respond normally to GA exposition with an increase hypocotyl length almost equal to wild type plants. Interestingly, *RGL1*, *RGL2* and *RGL3* DELLA genes were less expressed in *MIF2* overexpressor leaves than in wild-type leaves, indicating that *MIF2* and *MIF1* overexpressing lines do not show the same alterations of gene expressions concerning GA pathway.

Recently, Bueso *et al.* (2014) reported a link between *ATHB25* (*ZHD1*) and gibberellins in seed longevity. They showed that *ZHD1* over-expressor lines accumulate more GA4 and GA1 than wild-type plants. These accumulations of GA1 and GA4 result in an increased expression levels of *GA3OX2*, *GA20OX1* and *GA20OX3*, while *GA20OX4* and *GA20OX5* were repressed in this mutant. *GA3OX2* is repressed in antisense *ATHB25* lines confirming these results.

To search for potential common genes regulated by *MIF* and *ZHD*, I compared transcriptomic data for *MIF1* overexpressing plantlets (Hu *et al.*, 2006), *ZHD1* overexpressing plantlets from Bueso *et al.* 2014 and *ZHD11* overexpressing plantlets from Tran *et al.* 2006. These analyses revealed that around 12% of *35S::ZHD1* and 8% of *35S::ZHD11* up-regulated genes in *35S::MIF1* lines are also misregulated in *35S::MIF1*. Interestingly, two-thirds of these genes are inversely misregulated suggesting the opposite effect of MIF and ZHD

Table 1: List of common deregulated genes between 35S::MIF1, 35S::ZHD11 and 35S::ZHD1 plantlets
From data of **Hu et al. 2006** concerning 35S::MIF1, **Bueso et al. 2014** concerning 35S::ZHD1 and **Tran et al. 2006** concerning 35S::ZHD11.

Common deregulated genes with 35S::ZHD11 are highlighted in yellow

Up-regulated in both 35S::MIF1 and 35S::ZHD1	
AT5G24160	Squalene monooxygenase 1,2
AT4G19690	Fe(2+) transport protein 1
AT1G05280	AT1G05280
AT1G53920	GDSL esterase/lipase 5
AT3G56980	Transcription factor ORG3
AT3G51750	AT3G51750
Down-regulated in both 35S::MIF1 and 35S::ZHD1	
AT3G44970	AT3G44970
AT2G15050	Non-specific lipid-transfer protein 7
AT3G48970	AT3G48970
AT1G43590	AT1G43590
AT1G65960	Glutamate decarboxylase 2
AT3G17420	AT3G17420
AT3G47340	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]
AT5G49690	AT5G49690
AT1G26560	AT1G26560
AT2G33480	AT2G33480
AT1G31580	AT1G31580
AT4G16146	AT4G16146
AT5G02440	AT5G02440
AT1G52100	AT1G52100
AT5G26270	AT5G26270
AT4G27460	AT4G27460
AT5G42900	AT5G42900
AT5G36910	Thionin-2.2
Up-regulated in 35S::MIF1 and down regulated in 35S::ZHD1	
AT2G01530	MLP-like protein 329
AT3G16450	AT3G16450
AT3G03470	AT3G03470
AT1G18100	Protein MOTHER of FT and TF 1
AT2G43510	AT2G43510
AT2G46750	AT2G46750
AT1G47540	AT1G47540
AT5G44120	12S seed storage protein CRA1
AT1G48130	1-Cys peroxiredoxin PER1
AT2G35300	AT2G35300
AT2G33070	Nitrile-specifier protein 2
AT5G23830	AT5G23830
AT4G21830	AT4G21830
AT4G19810	AT4G19810
AT1G02220	NAC domain-containing protein 3
AT3G53980	AT3G53980
AT1G73330	AT1G73330
AT3G14210	GDSL esterase/lipase ESM1
AT2G38870	AT2G38870
AT4G15910	AT4G15910
AT5G54300	AT5G54300
AT5G08565	Transcription elongation factor SPT4 homolog 1
AT3G59220	Pirin-1
AT3G29250	AT3G29250
AT2G43590	AT2G43590
AT1G23130	AT1G23130
AT4G33730	AT4G33730
AT5G58670	Phosphoinositide phospholipase C 1
AT5G59310	Non-specific lipid-transfer protein 4
AT3G26320	Cytochrome P450 71B36
AT3G24240	Receptor-like protein kinase 2
AT1G73600	Putative phosphoethanolamine N-methyltransferase 3
AT5G47220	Ethylene-responsive transcription factor 2
AT2G28490	AT2G28490
AT5G59320	Non-specific lipid-transfer protein 3
AT2G43620	AT2G43620
AT5G25020	AT5G25020
AT3G21380	AT3G21380
AT3G50970	Dehydrin Xero 2
AT1G27730	AT1G27730
AT4G12480	AT4G12480
AT5G23010	Methylthioalkylmalate synthase 1, chloroplastic
AT4G12500	AT4G12500
Up-regulated in 35S::ZHD1 and down regulated in 35S::MIF1	
AT3G16370	GDSL esterase/lipase APG
AT1G12080	AT1G12080
AT1G06350	Delta-9 desaturase-like 4 protein
AT5G39860	AT5G39860
AT4G37770	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8
AT3G15500	NAC domain-containing protein 55
AT1G08630	AT1G08630
AT1G73120	AT1G73120
AT4G32280	Auxin-responsive protein IAA29

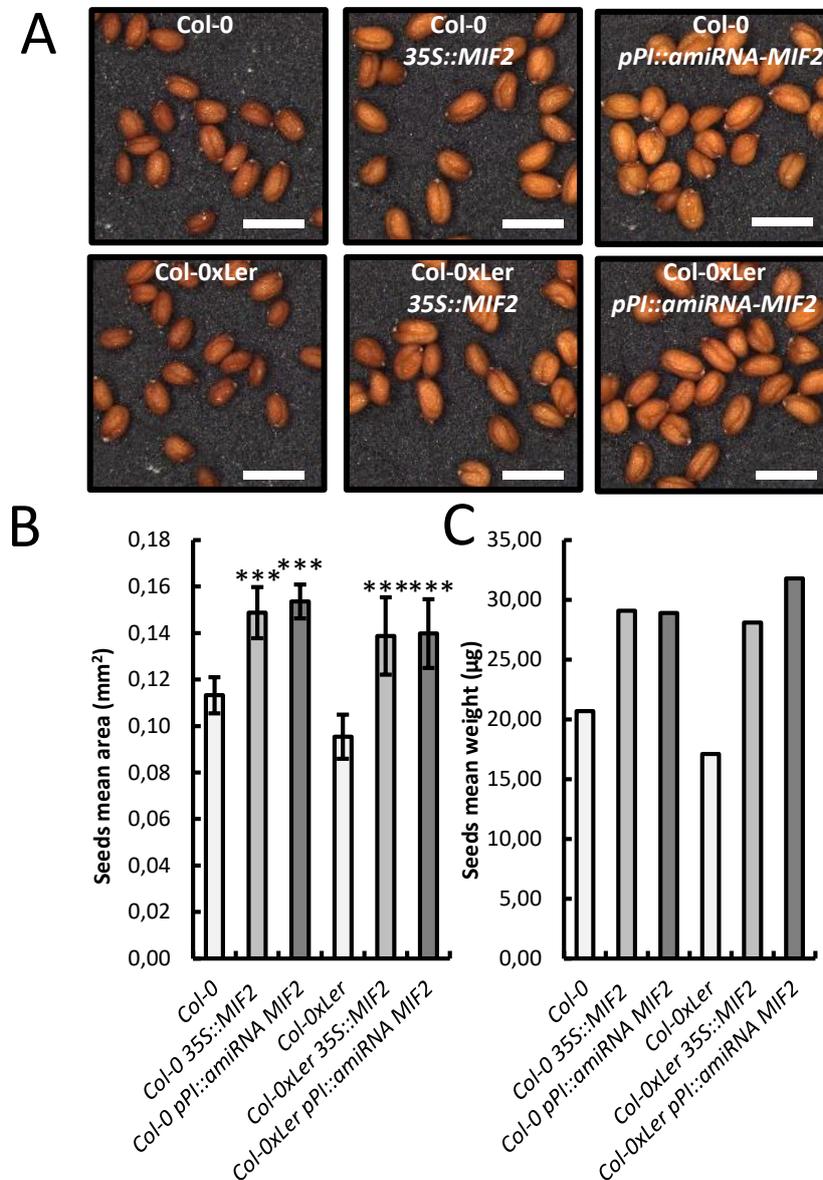


Figure 60 : Seeds size and weight are increased in *MIF2* gain- and loss-of-function lines.

(A) Representative dry seeds of wild type (Col-0 and Col-0xLer), *MIF2* overexpressors (Col-0-35S::*MIF2* and Col-0xLer-35S::*MIF2*) and loss-of-function (Col-0 pPI::*amiRNA-MIF2* and Col-0xLer-pPI::*amiRNA-MIF2*). Bars, 3mm.

Means from three independent experiments of the projected area of 100 dry seeds from independent line.

(C) Means mass of 1000 dry seeds from each line.

Error bars indicate SD, and asterisks indicate significant differences from the control (Col-0 or Col-0xLer) using two-tailed t-test (* P<0.01, ** P<0.001, ***P<0.0001).

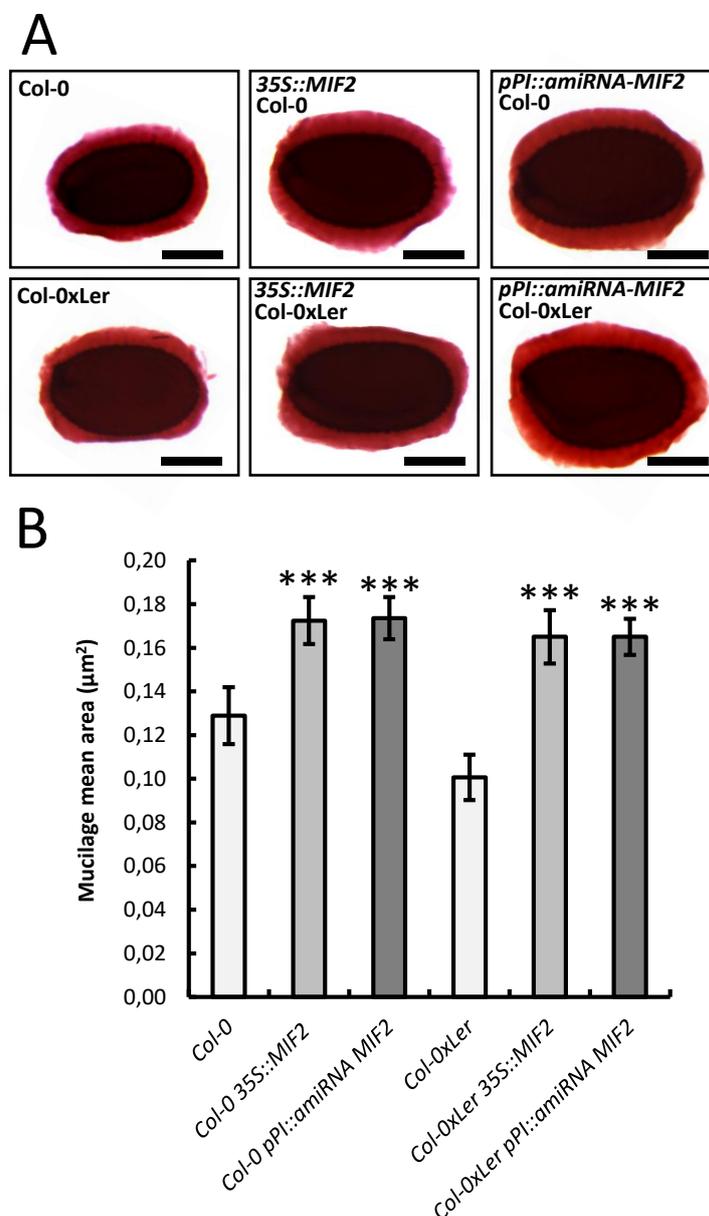


Figure 61: Seeds mucilage area is increased in *MIF2* gain and loss-of-function lines.

(A) Representative Seeds stained with ruthenium red after first shaking in water.

Bars, 400µm.

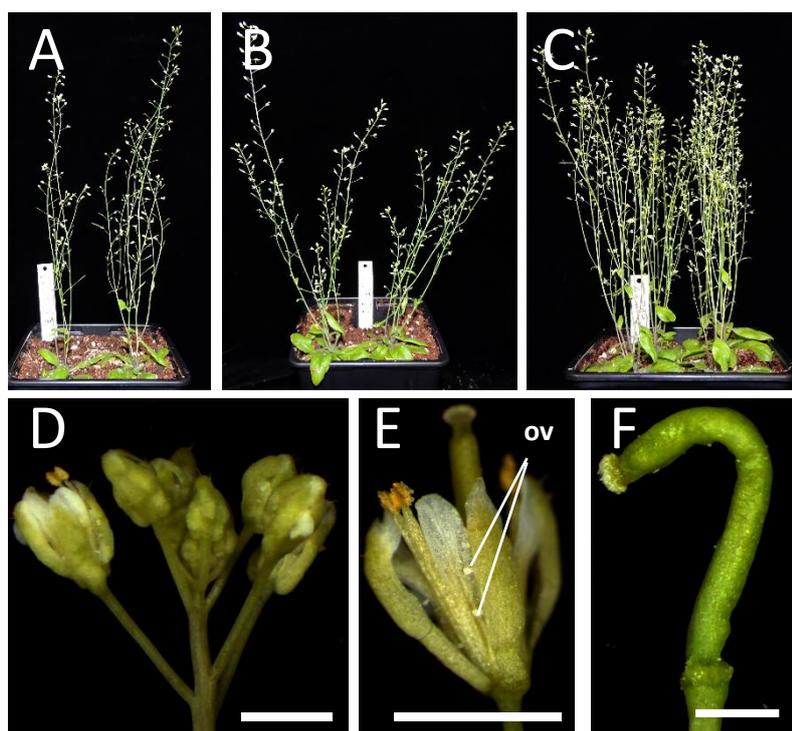
(B) Measure of the surrounded mucilage area. Each value is the mean of 20 seeds from three different batches.

Error bars indicate SD, and asterisks indicate significant differences from the control (Col-0 or Col-0xLer) using two-tailed t-test (***) $P < 0.001$.

over-expression (**figure 59**). Interestingly among these genes, one is the *bHLH* transcription factor *ORG3* involved in iron homeostasis (by consequence in chlorophyll synthesis) and already described as responding to GA (**Matsuoka et al., 2013**). Despite the fact that the number of common misregulated genes could be considered as low compared to the total number of misregulated genes in these plants, most of these genes are related to seed development and GA pathway strengthening the hypothesis of the involvement of several ZHD and MIF members in this pathway (**table 1**).

Because of the inhibitory effect of MIF protein on the activity of ZHD, the observed response of *MIF* overexpressing plants could not be representative of the real function of MIF, but it could be linked to their ectopic effect on ZHD protein. In order to analyze the physiological involvement of *IMA* in GA response, **Sicard et al. (2008)** analyzed the effects of GA₃ treatments on transgenic RNAi lines. GA₃ treatments resulted in an outgrowth of carpel organs emerging from the first forming carpel structures. The effects of a prolonged GA₃ treatment amplified the formation of multi-carpellar structures in young developing fruits of *35S::IMA-RNAi* plants. Moreover, the same treatment was made on *35S::IMA^{ch}* loss-of-function plants. When these plants were treated by GA₃, a strong increase in the number of newly formed carpels was observed including loss of carpel fusion that led to apocarpic structures and to the production of new flowers from the original structure. Under a prolonged GA₃ treatment, the carpellar structures kept on developing on the outside of the fruit. Altogether these results suggest that *IMA* loss-of function carpels are hypersensitive to GA₃ confirming the involvement of *IMA/MIF2* in GA response regulation.

Because the results of **Bueso et al. (2014)** were of prime interest in the regulation of seed development, I decided to investigate the effects of *MIF2* misexpression on seed phenotype and I analyzed the size and mass of the dry seeds in *MIF2* gain- and loss-of-function plants. Surprisingly, these analyses revealed that both *MIF2* gain- and loss-of-function displayed an increased seed size and weight (**figure 60**) compared to wild type genotypes. The seed size and weight increased in DELLA mutant where GA response is derepressed (**Bueso et al., 2014**) or in *GA3ox4* loss-of-function mutants where GA synthesis is decreased (**Kim et al., 2005**) is accompanied by an increased mucilage synthesis. I further analyzed the mucilage area of *MIF2* gain- and loss-of-function seeds. As for seed size, *MIF2* gain- and loss-of-function plants have



G ■ Col-0 ■ *amiRNA-zhd-1* ■ *amiRNA-zhd-2* ■ *amiRNA-zhd-3*

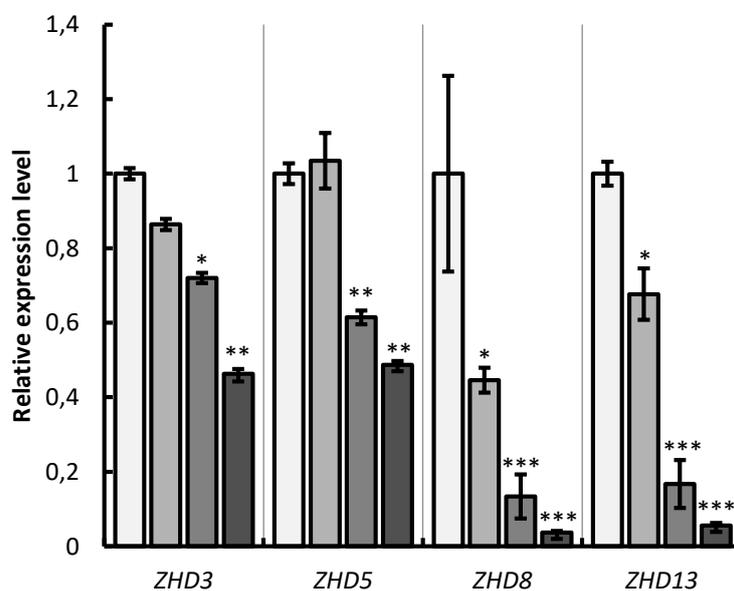


Figure 62: Multiple ZHD genes silencing in 35S::amiRNA-ZHD induces vegetative and floral alteration.

(A-C) Vegetative phenotype of 35S::amiRNA-ZHD-1 (A) 35S::amiRNA-ZHD-2 (B) 35S::amiRNA-ZHD-3 (C).

(D) Inflorescence of 35S::amiRNA-ZHD-3.

(E) Flower of 35S::amiRNA-ZHD-3 with ectopic ovule (ov) formation on sepals(F) Young curved silique of 35S::amiRNA-ZHD-3. Bars, 3mm

(G) ZHD genes expression analysis in 35S::amiRNA-ZHD lines. Error bar indicate SD of three biological replicates and asterisks indicate significant differences from the control (Col-0) using two-tailed t-test(*P<0.05 , **P<0.01, ***P<0.001).

an increased mucilage surface (**figure 61**). These results are consistent with the decrease of DELLA gene expression levels in *MIF2* overexpressing lines.

As demonstrated by **Bueso et al. (2014)**, *ZHD1* is involved in GA response, but the stronger phenotypic effects are observed in transgenic lines in which an antisense strategy targeted several *ZHD* genes (*ZHD1*, *ZHD2* and *ZHD4*). The phenotypic modifications are reminiscent to those observed in MIF gain-of-function plants. In order to complete this study, I investigated the potential involvement of other *ZHD* genes by analyzing three amiRNA lines targeting 9 of the 14 *ZHD* sequences (*amiRNA-zhd1*, *amiRNA-zhd2*, *amiRNA-zhd3*). These three lines displayed the same vegetative alteration as moderate MIF overexpressor plants, showing dwarfism and a loss of apical dominance characterized by a bushy phenotype (**figure 62 A-C**). Interestingly floral development was also affected in the same way than in *35S::MIF2* lines with fused sepals (**figure 62D**), ectopic ovule on sepals (**figure 62E**) and curved gynoecium (**figure 62F**).

Expression analysis of *ZHD* genes in these lines revealed that only four *ZHD* genes were down-regulated in these lines (*ZHD3*, *ZHD5*, *ZHD8* and *ZHD13*) at different levels (**figure 62G**). Seed size measurements were made in these lines and in *zhd9* and *zhd13* single mutants that revealed a decreased area in *zhd9* and *zhd13* single mutants and a stronger decrease in *amiRNA-zhd2*, *amiRNA-zhd3* lines. The *amiRNA-zhd1* lines, which are the less impacted in *ZHD* expressions had a normal seed size (**figure 63**). Altogether, these results suggest that several *ZHD* and MIF genes play a role in seed size control in the same regulation pathway.

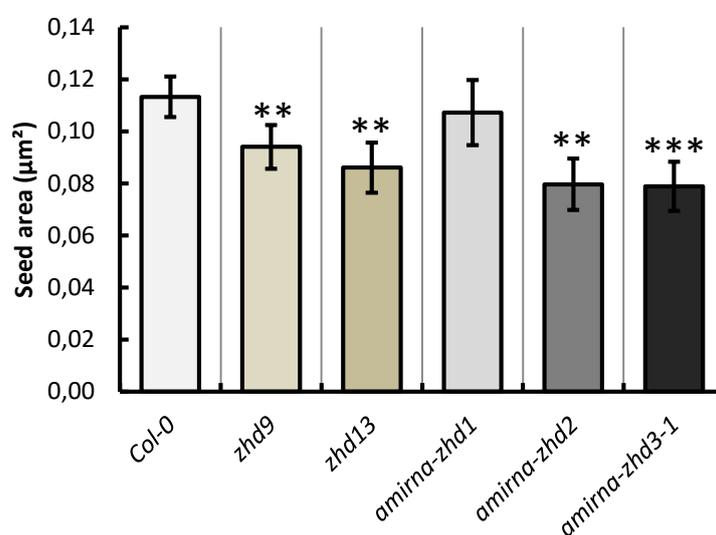


Figure 63: ZHD loss-of-function lines display reduced seed size.
Means from three independent experiments of the projected area of 100 dry seeds from each line.
Error bars indicate SD, and asterisks indicate significant differences from the control (Col-0) using two-tailed t-test (** P<0.01, ***P<0.001).

Table 2: Summary of number and reported publication about the ZHD and MIF genes of each species.

Classification		Species	Number of ZHD_MIF	Publications reporting ZHD role	
Angiosperms	Dicots	Malvids	<i>Arabidopsis thaliana</i>	14_3	Hong <i>et al.</i> , 2011 (<i>AtMIF1</i> , <i>AtZHD5</i>); Hu and Ma 2006 (<i>AtMIF1</i> , <i>AtMIF3</i>); Hu <i>et al.</i> , 2011 (<i>AtMIF1</i> , <i>AtMIF2</i> , <i>AtMIF3</i>); Hu, De Pamphilis and Ma 2008; Tran <i>et al.</i> , 2007 (ZHD11); Bueso <i>et al.</i> , 2014 (<i>AtZHD1</i>); Tan and Irish 2006 (ZHD5); Wang <i>et al.</i> , 2011 (ZHD5)
			<i>Arabidopsis Lyrata</i>	14_3	
			<i>Brassica rapa</i>	25_8	Wang <i>et al.</i> , 2015 (Phylogenetic and expression analysis of chinese cabbage ZHD)
			<i>Capsella rubella</i>	14_3	
			<i>Carica papaya</i>	8_2	
			<i>Theobroma cacao</i>	12_5	
			<i>Citrus sinensis</i>	10_3	
		<i>Citrus clementina</i>	10_2		
		Fabids	<i>Malus domestica</i>	18_5	
			<i>Fragaria vesca</i>	7_2	
			<i>Cucumis sativus</i>	10_3	
			<i>Cucumis Melo</i>	10_3	
			<i>Medicago truncatula</i>	9_6	
			<i>Glycine max</i>	42_12	Park <i>et al.</i> , 2007 (GmZF-HD1 and GmZF-HD2)
	Asterids	<i>Populus trichocarpa</i>	17_4		
		<i>Vitis vinifera</i>	13_5	Wang <i>et al.</i> , 2014 (Phylogenetic and expression analysis of grapevine ZHD)	
		<i>Solanum lycopersicum</i>	12_10	Sicard <i>et al.</i> , 2008 (Inhibitor of Meristem Activity (IMA))	
		<i>Solanum pennellii</i>	11_4		
		<i>Solanum melongena</i>	10_3		
		<i>Solanum tuberosum</i>	14_5		
		<i>Nicotiana benthamiana</i>	26_7		
	Monocots	Poaceae	<i>Capsicum anuum</i>	9_7	
			<i>Coffea canefora</i>	8_3	
<i>Zea mays</i>			19_5		
<i>Sorghum bicolor</i>			10_4		
<i>Triticum aestivum</i>			7_6	Abu-Romman <i>et al.</i> , 2013 (TaZF-HD1)	
<i>Oryza sativa</i>			11_4	Xu <i>et al.</i> , 2014 (OsZHD1)	
<i>Hordeum vulgare</i>			6_3		
<i>Brachypodium dystachyon</i>	13_4				
		<i>Musa acuminata</i>	25_2		
		<i>Amborella trichopoda</i>	7_2		
Gymnosperms	Coniferopsida	<i>Picea abies</i>	3_10 ?		
		<i>Picea Glauca</i>	4_2 ?		
		<i>Picea Taeda</i>	13_5 ?		
Lycopodiophyta		<i>Selaginella moellenlorfii</i>	4		
Bryophyta		<i>Physcomitrella patens</i>	7		

Part II : ZHD and MIF regulatory network and interaction specificity

ZHD genes in angiosperms

The first phylogenetic analysis of *ZHD* genes was done in 2008 by Hu, de Pamphilis and Ma revealing that *ZHD* genes constitute a plant-specific family of intronless genes widely present in all land plants. Since new genomic information is now available, I decided to make an update, I carried out an extensive search in public sequence databases using BLAST. Around 600 unique sequences of *ZHD* including around 150 *MIF* genes were identified in 36 species. The number of identified *ZHD* and *MIF* genes in each species is reported in **table 2** showing the huge diversity in number and. The new phylogenetic analysis revealed almost the same results as the previous publication identifying seven major clades (**Hu, de Pamphilis and Ma**).

ZHD expression pattern

Firstly described as flower-expressed genes in *A. thaliana* (**Hu et al., 2003**), *ZHD* genes have a wide expression pattern in all species (**Wang et al., 2014; Wang et al., 2015**). I made use of available transcriptomic data from public databases (the BioAnalytic Ressource for plant Biology (BAR) for soybean (*Glycine Max*), potato (*Solanum tuberosum*), rice (*Oryza sativa*), maize (*Zea mays*), poplar (*Populus trichocarpa*), and the Tomexpress database for tomato from the Genomic and Biotechnology of the Fruit laboratory (GBF, INRA/INPT-ENSAT), but also more specific published data (**Hu and Ma, 2006** for *A. thaliana*; **Wang et al., 2015** for Chinese cabbage (*Brassica rapa*); **Wang et al., 2014** for grapevine (*Vitis vinifera*)) to analyze the expression pattern of *ZHD* and *MIF* genes in a wide range of species to decipher the potential conservation of the expression pattern of the subclades revealed by phylogenetic analysis. I compared the expression in several related species (**figure 64**) and made a heatmap comparing the expression levels between different organs for each gene (**figure 64**). Almost all *ZHD* genes are strongly expressed in the stem, the leaves and the flowers but very few are specific to a particular organ. Several related genes in term of sequence exhibited similar expression patterns: - clade V only contains *brassicaceae* genes and is made of roots and flower expressed genes; - clade VI contains genes with a wide expression pattern; - clade III

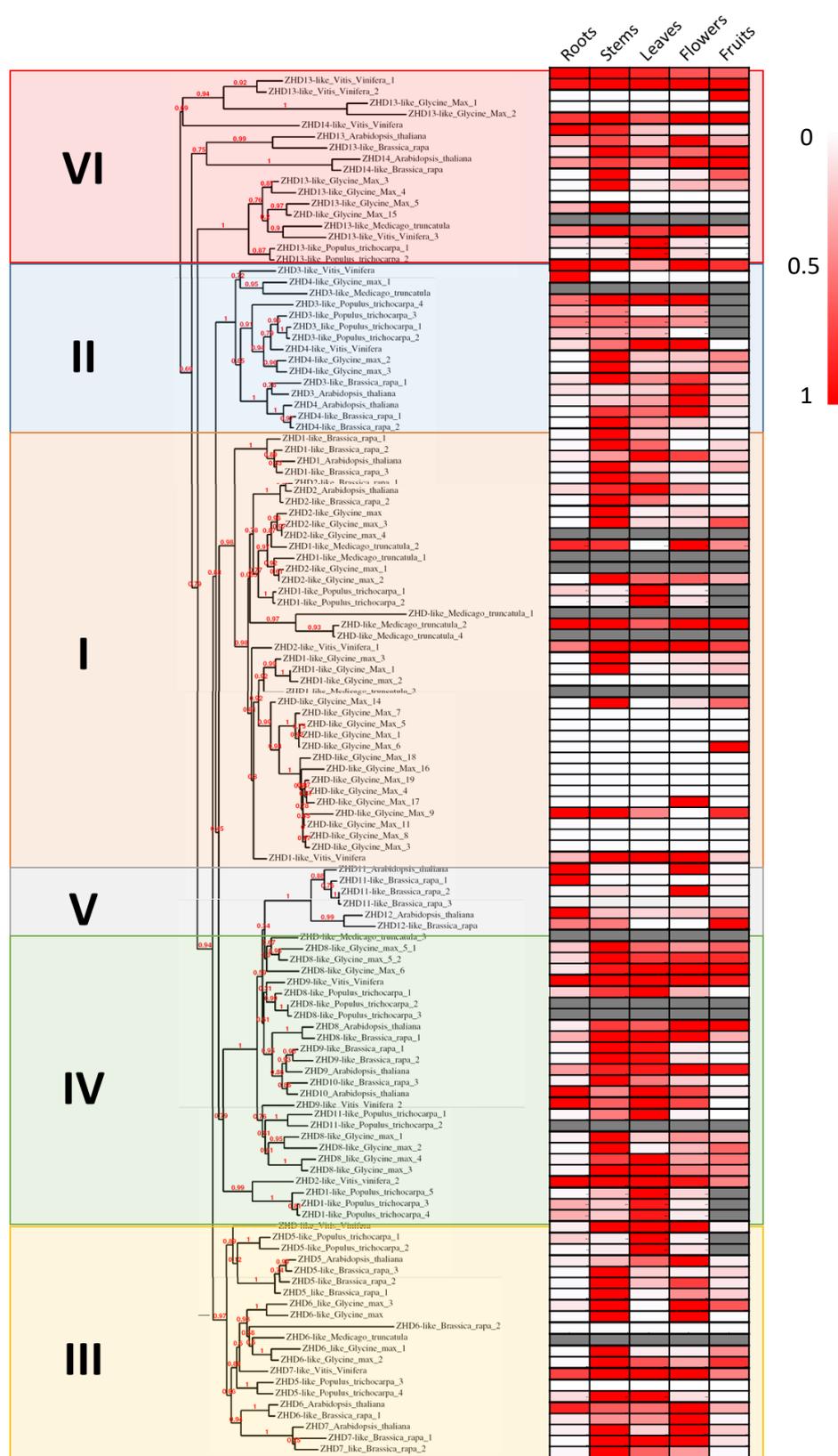


Figure 64: Phylogenetic relationship and expression analysis of ZHD genes. Maximum parsimony phylogenetic tree was made using several Malvids and Fabids ZHD protein sequences. Bootstrap values from maximum parsimony analysis is provided in red. Clades I to VI were defined according to Hu, De Pamphillis and Ma 2008. Heat map representation indicate relative expression levels for the differents organs considered for each gene. The bar at the top-right of the heat map represents relative expression values.

contains numerous stem and flower expressed genes and clade IV contains several stem, leaves and flower expressed genes. Moreover numerous genes in clade I are not or lowly expressed in the studied samples (**figure 64**). Despite these expression similarities between genes of each clades, I observed a really low conservation of the expression pattern between genes of the different clades, suggesting important variation in each species.

Sequence alignments and phylogenetic analyses for *ZHD* genes in each species were made as to classify them by homology. I made use of expression data to generate a heatmap for each species. Each species-specific heatmap was ordered following evolutionary relationships between species (**figure 65**). As a result, each species have a common global pattern of expression for *ZHD* genes without important conservation between related species (**figure 65**). Almost all genes are mainly expressed in stems in *Glycine max* and *Brassica rapa*, in leaves in poplar, in flowers in *A. thaliana* and in tomato, and almost all *ZHD* genes are expressed in all organs in *Vitis vinifera*. In rice, *ZHD* genes are more expressed in leaves and flowers, and in maize there are globally two subgroups: the first contains genes expressed in all organs and the second genes with no expression in roots. In potato, there are three subgroups of genes: the first with leaf- and stem specific expression, the second without any expression in the tested samples and the third with stem and flower expressed genes (**figure 65**). These species-specific expression suggests that *ZHD* gene expression is different to ensure the required function in each species. It could be interesting to determine whether similar ZHD-regulated genes or protein partners follow the same pattern of expression between species.

MIF and ZHD interaction network

Since many ZHD proteins do not contain any activation domain, physical interactions between ZHD proteins and other proteins seem to be essential for their function. Since many of the interactions between MIF and ZHD protein were tested by yeast-two hybrid experiments and pull down assays (**Hong et al., 2010**). I choose several ZHDs according to their different ability to interact with MIF proteins as shown by **Hong et al. (2010)**. First, I analyzed the subcellular localizations of each ZHD (**figure 66A**). As expected, the ZHD proteins were localized in the nucleus and the three MIF proteins were localized both in the cytosol and in the nucleus (**figure 66A**). Next, I tested the different combinations by BiFC to localize at the subcellular level the interaction with MIFs (ZHD4, ZHD5, ZHD9 and ZHD11). Our results

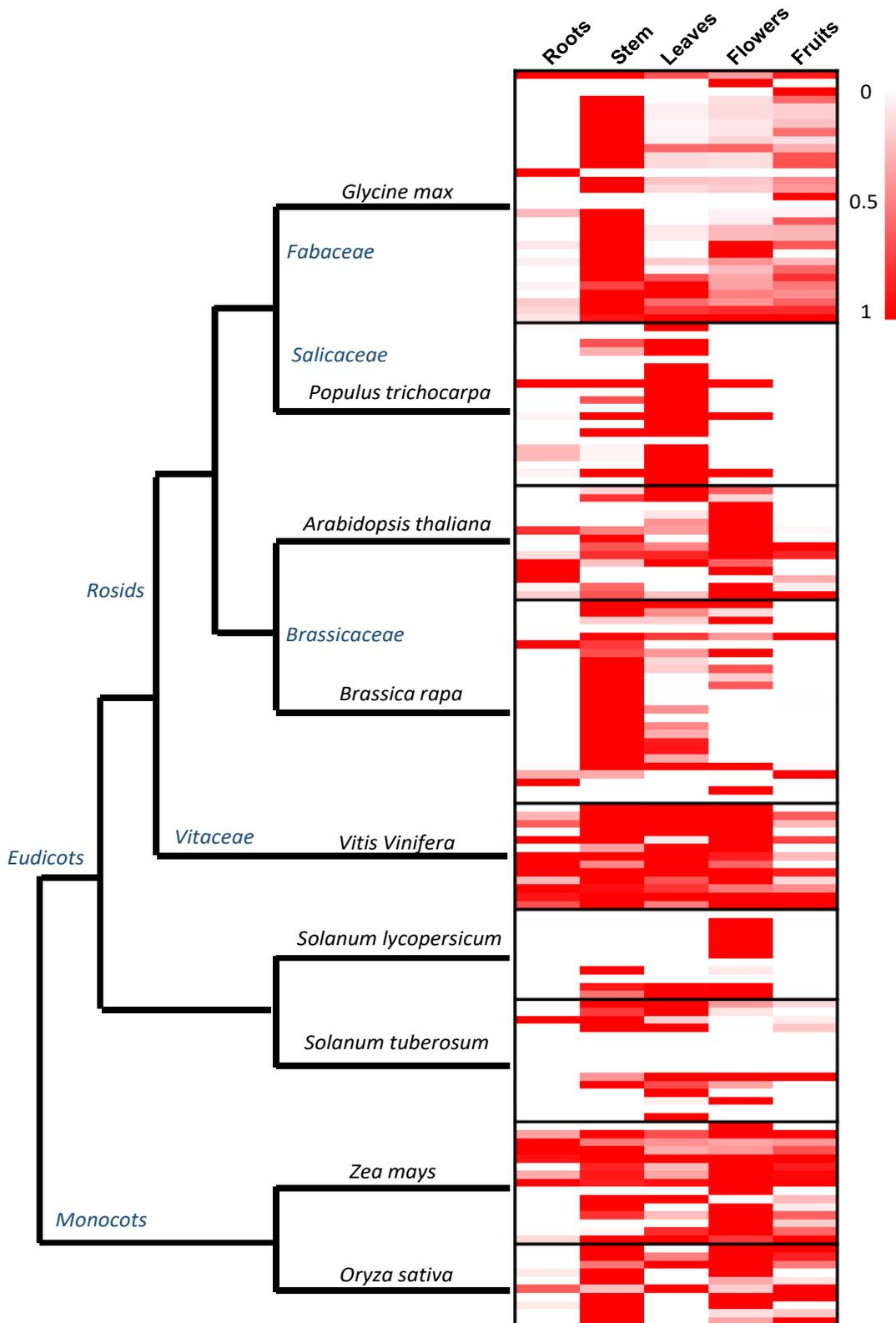


Figure 65: Species relationships and expression analysis of ZHD genes.

The tree is a cladogram showing relationship between considered species.

Heat map representation indicate relative expression levels in each species for the different organs considered for each ZHD gene. The bar at the top-right of the heat map represents relative expression values.

only partially confirmed previous results obtained by **Hong *et al.* (2011)** (**figure 66B and 66C**). ZHD11 was not able to homodimerize and ZHD9 was able to dimerize but also to interact with MIF1 and MIF2. There are several possible explanation of this difference of results due to the difference between Y2H and BiFC systems. In BiFC, high level expression of split fluorescent protein can lead to the detection of non-specific binding, which results in false positives, or conformational modification due to YFP fusion could led to false negative. In Y2H, false positive due to auto-activation or false negative due to absence of post-traductional modification such as phosphorylation or misfolding. Despite these differences, our results was concordant for the interactions/absence of interaction between several ZHDs and MIFs proteins confirming the interaction specificity between MIFs and ZHD proteins. The reason for this specificity is still unkown and sequence comparison does not reveal any correlation between specific motifs and ZHD interactions.

In order to create an intelligible representation of the genetic and proteic interaction network involving MIF and ZHD in floral development, informations from specific experiments or “omics” experiments (ChIP-seq, Interactomic databases, RNA-seq...) were compiled to build an interaction network (**figure 67**).

An interesting aspect in creating this network was the exploitation of ChIP-seq data obtained using SEP3, AG, AP3, PI and WUS proteins (**Pajoro *et al.*, 2014 ; Yant *et al.*, 2010 ; Kaufmann *et al.*, 2010 ; Gomez-Mena *et al.* 2005 ; Wuest *et al.*, 2012; Busch *et al.* 2010**). These data revealed that several *ZHD* genes are direct targets of AG, PI, AP3 and SEP3 indicating their involvement in the floral development mechanism. Interestingly, the ChIP against SEP3 experiments revealed that SEP3 binds *MIF2* promoter in wild type plant but not in *ag* mutant suggesting that the two proteins are necessary for *in vivo* regulation of *MIF2*, confirming our previous result about *MIF2* regulation by AG.

Because MIF proteins have essential roles in protein-protein interaction, a lot of effort was done to combine the informations about the interactions between members of the ZHD family and other proteins. Numerous proteins were identified as ZHD interactants : for example, a recent work on ZHD11 (but also ZHD3 and ZHD8) by Barth *et al.*, revealed their ability to interact with HIPP (Heavy metal associated isoprenylated plant protein) (**Barth *et al.*, 2009**). Tran *et al.*, in 2006 demonstrated the interaction between ZHD11 and NAC domain containing

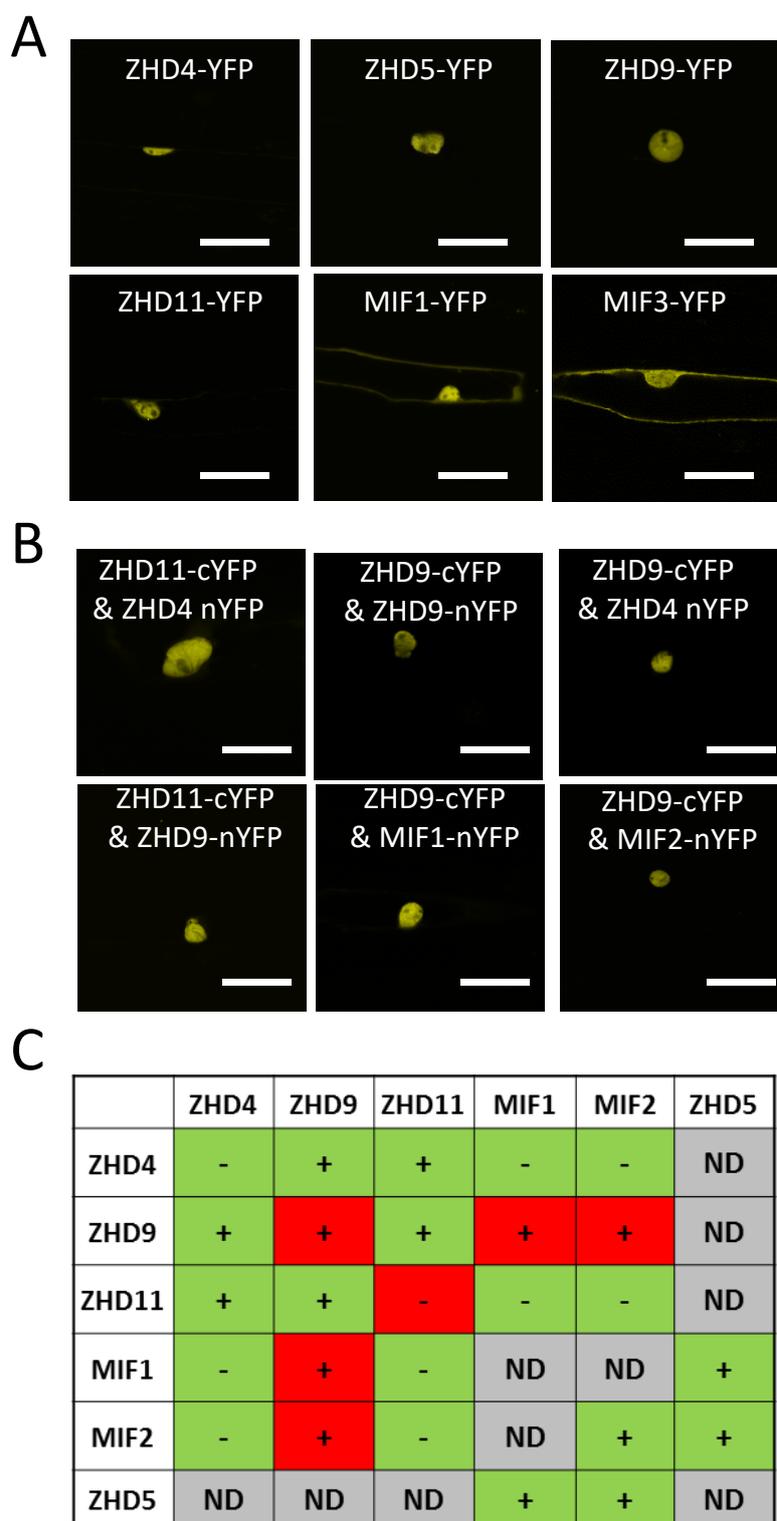


Figure 66: *In cellulo* localizations and interactions between ZHD and MIF proteins.

(A) Subcellular localizations in onion epidermal cells of MIF and ZHD proteins.
 (B) BiFC analyses in onion epidermal cells of the interactions between MIF and ZHD proteins.

(C) Comparative table between BiFC and yeast-two hybrid results from Hong *et al.*, and Hu *et al.*, 2008 (similar results are in green, different in red, ND : not tested in our study).

Bar. 75µm.

an enriched His domain which could be involved in metal ion interaction (**Tran et al., 2006**). Interestingly interactomic databases revealed that ZHD11 is also able to interact with AT4G38580.1 (FP6 : farnesylated protein 6; Heavy-metal-binding protein) and also with IAA8 and IAA10. Furthermore, I have demonstrated that MIF proteins are able to interact with ZHD zinc finger domain, C₂H₂ zinc finger protein such as in KNUCKLES or SUPERMAN, CSN5 signalosome subunit, and also HDA, demonstrating the wide range of partners of MIF proteins.

As a common feature for these partners, the presence of a metallodomain seems to be a prerequisite to allow the interaction with MIF proteins. The only known partners of ZHD proteins that do not contain any metallodomain are the IAA proteins. But, even if IAA proteins do not contain any metallo-domain, we know that they interact with auxin molecules mimicking a positive charge. In the case of ABP1, the interaction with auxin is mediated by the zinc-ion inside (**Grones et al., 2012**). A recent study on metalloprotein inhibitors (**Day and Coen, 2013**) has shown that off-target inhibition is limited, even when inhibitors contain similar or identical metal binding domain. These results suggest that structural features of the proteins limit the accessibility of the metallodomain to the inhibitors explaining their specificity. The case of MIF seems to be similar to metalloprotein inhibitors. MIF proteins are not prone to interact with every metalloprotein suggesting that structural features of MIF allow specificity of the interaction. This interaction specificity between MIF and ZHD proteins and the ability of MIF proteins to interact with proteins that exhibit zinc-fingers but that belong to other protein families such as CSN5 or KNU, raised the question of the mechanisms of interactions between MIF proteins and these proteins. Little is known about MIF protein structure and how the structure may affects the associated function(s).

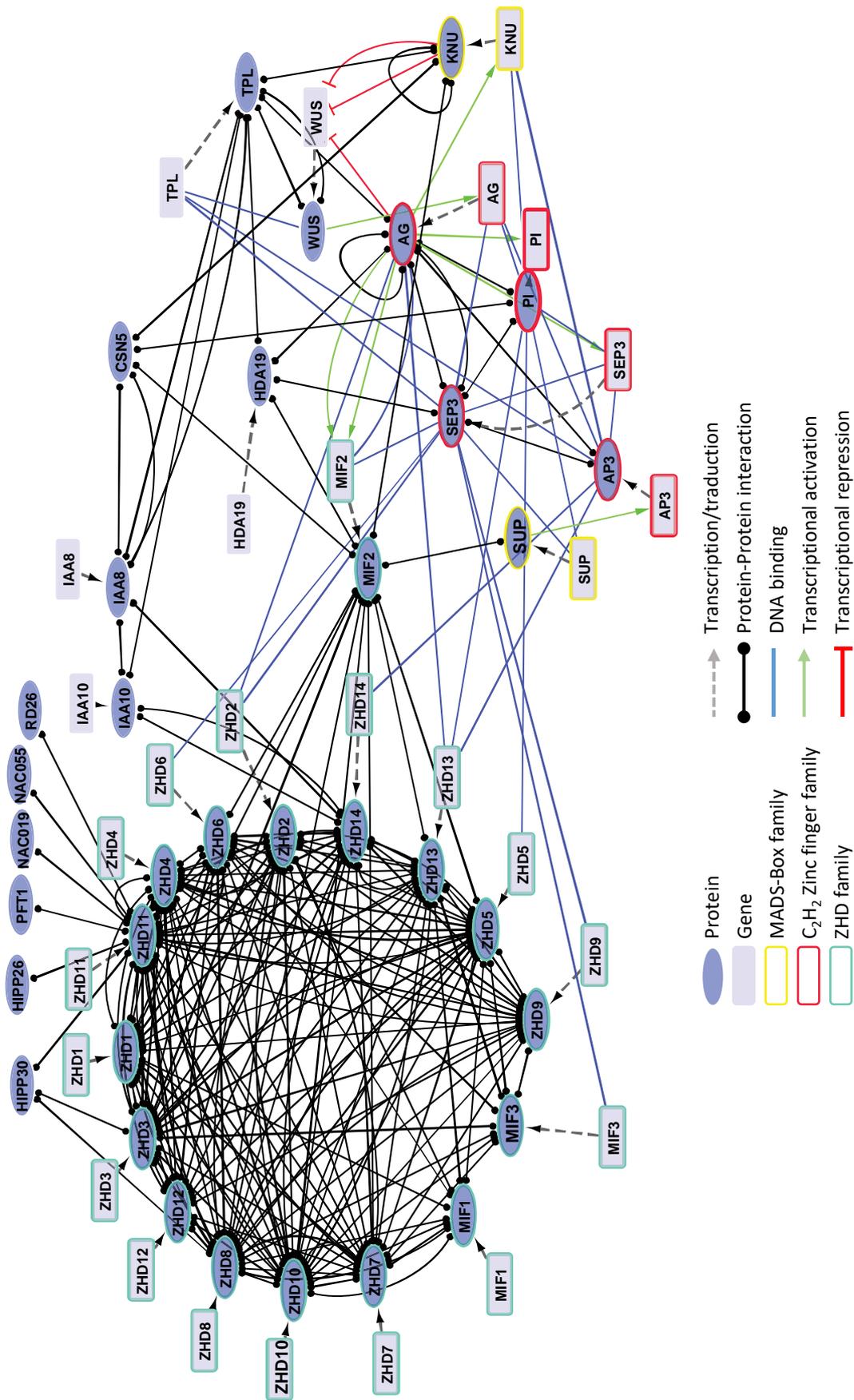


Figure 67: Analysis of the ZHD regulatory network in *A. thaliana*.

This network was realized using public dataset from ChIP-seq experiments (Pajoro *et al.*, 2014 ; Yant *et al.*, 2010 ; Kaufmann *et al.*, 2010 ; Gomez-Mena *et al.*, 2005 ; Wuest *et al.*, 2012; Busch *et al.*, 2010), Protein-Protein interactions data (Hong *et al.*, 2009, Tran *et al.*, 2006, Hu and Ma 2006) and personal BiFC results.

MIF2 subcellular localization, structure and interaction ability

This part of the results and discussion section corresponds to an article draft describing the analyses of MIF protein structure, particularly their intrinsic disorder and the role of phosphorylation in IMA and MIF2 subcellular localization and interaction ability. The Material and Methods part is shown separately (see Material and Methods section).

Article 2 : The protein interaction ability of Mini zinc Finger 2 (MIF2) and its subcellular localization are controlled by the phosphorylation status within intrinsic disordered regions

Norbert Bollier^a, Frédéric Gévaudant^a, Christian Chevalier^a, Michel Hernould^{a,*} and Frédéric Delmas^a

^aUMR1332 BFP, INRA, Univ. Bordeaux, 33882 Villenave d'Ornon Cedex, France.

*Corresponding author: hernould@bordeaux.inra.fr

Introduction

Plant development involves a complex genetic regulatory network finely tuned by a huge number of transcriptional factors. These transcription factors are themselves regulated at different levels, from expression to activity in order to ensure the accomplishment of the developmental programs. Recent studies indicate that microproteins (miPs) play an important regulatory role by interacting with transcription factors, activating/inhibiting their activity or allowing multimeric complex formation (for a review see **Eguen et al., 2015**).

The Zinc-finger homeodomain (ZHD) gene family encompasses 17 genes in *Arabidopsis thaliana*, involved in flower development and plant adaptation to environmental stresses (**Hu, De Pamphilis and Ma, 2008**). Among these ZHD proteins, fourteen contain both a zinc finger domain involved in protein-protein interactions and a homeodomain involved in protein-DNA interactions. The three other proteins from this family contain solely the zinc finger domain and have been named Mini Zinc Finger (MIF) proteins. Protein/protein interaction assays between members of this family revealed their ability to form homo- and heterodimers and their interaction specificity (**Hong et al. 2011**). It has been shown that MIF proteins could act as inhibitors of ZHD5 through the formation of inactive heterodimers and through the exclusion of the ZHD5 protein outside of the nucleus (**Hong et al., 2011**). Recent studies showed that microproteins could also act as adaptor proteins to allow the formation of multimeric complexes (**De Graeff et al., 2016**). In a previous study, we showed that MIF proteins are not just ZHD inhibitors but could also interact with other proteins to act as adaptors facilitating the formation of a deacetylation complex involving the C₂H₂ transcription factor KNUCKLES and two other proteins, TOPLESS and HDA19 (**Bollier et al., submitted**). Interestingly, ZHD and MIF family members are also able to interact with a wide range of other proteins from different families such as HIPP (**Barth et al., 2009**), NAC-domain protein (**Tran et al., 2006**), or the signalosome subunit CSN5 (**Leblond, 2011**) indicating their flexibility and broad role in developmental processes and plant stress responses.

Altogether, these findings thus suggest that MIF proteins may have a wide range of functions depending on their protein partner but the mechanisms by which MIF proteins act remain poorly understood.

In the present study, we aimed at deciphering more precisely the different parts of MIF proteins involved in multiple protein-protein interactions. We based our analyses on Tomato and *A. thaliana* MIF proteins as models, because of their already well known functions and targets. We here provide an exhaustive identification of MIF proteins in tomato and demonstrated the high level of conservation at the N-termini between *A. thaliana* and tomato MIF proteins.

Since proteins harboring an intrinsic disorder (ID) have been shown to be able to interact with multiple partners through these flexible regions conferring high specificity and low affinity to protein-protein interactions (**Dyson et al., 2005**), we performed an ID prediction and showed that a common feature of MIF proteins lies in the N- and C-terminal ID. Furthermore, we showed that the N-terminal region contributes to the interaction of IMA or MIF2 with other MIF members or with the transcription factor KNUCKLES. Last we demonstrated that phosphorylation is necessary for their subcellular localization and their interaction ability.

Results and discussion

MInzinc Finger family in Solanaceae: phylogenic and expression analysis

To identify MIF proteins in different *Solanaceae* species, several full-length *A. thaliana* MIF protein sequences were used as a query to search tomato homologs within the GenBank non-redundant protein database and the Sol Genomics Network (SGN) (**Fernandez-Pozo et al., 2015**) using the BLAST-P program. We identified 10 sequences in the *Solanum lycopersicum* genome, 4 in *Solanum pennellii*, 3 in *Solanum melongena*, 5 in *Solanum tuberosum*, 7 in *Nicotiana benthamiana* and 7 in *Capsicum annuum*, that all display the non-canonical C₅H₃ zinc finger domain in the absence of any homeodomain. Phylogenetic analyses using *Solanaceae* and *Brassicaceae* MIF protein sequences revealed 6 subgroups (**figure 68**). Expression data from public databases (Tomexpress database from Genomic and Biotechnology of the Fruit laboratory (GBF, INRA/INPT-ENSAT) for tomato, BioAnalytic Ressource for plant Biology (BAR) for potato, as well as published specific datasets for *A thaliana* (**Hu and Ma, 2006**) and for *Brassica rapa* (**Wang et al., 2014**) confirmed the differences between genes of each subgroup (**figure 68**). In fact, the *MIF1/MIF3* subgroup contains root- and stem-expressed genes probably deriving from a common ancestor. The separation between *Brassicaceae* and

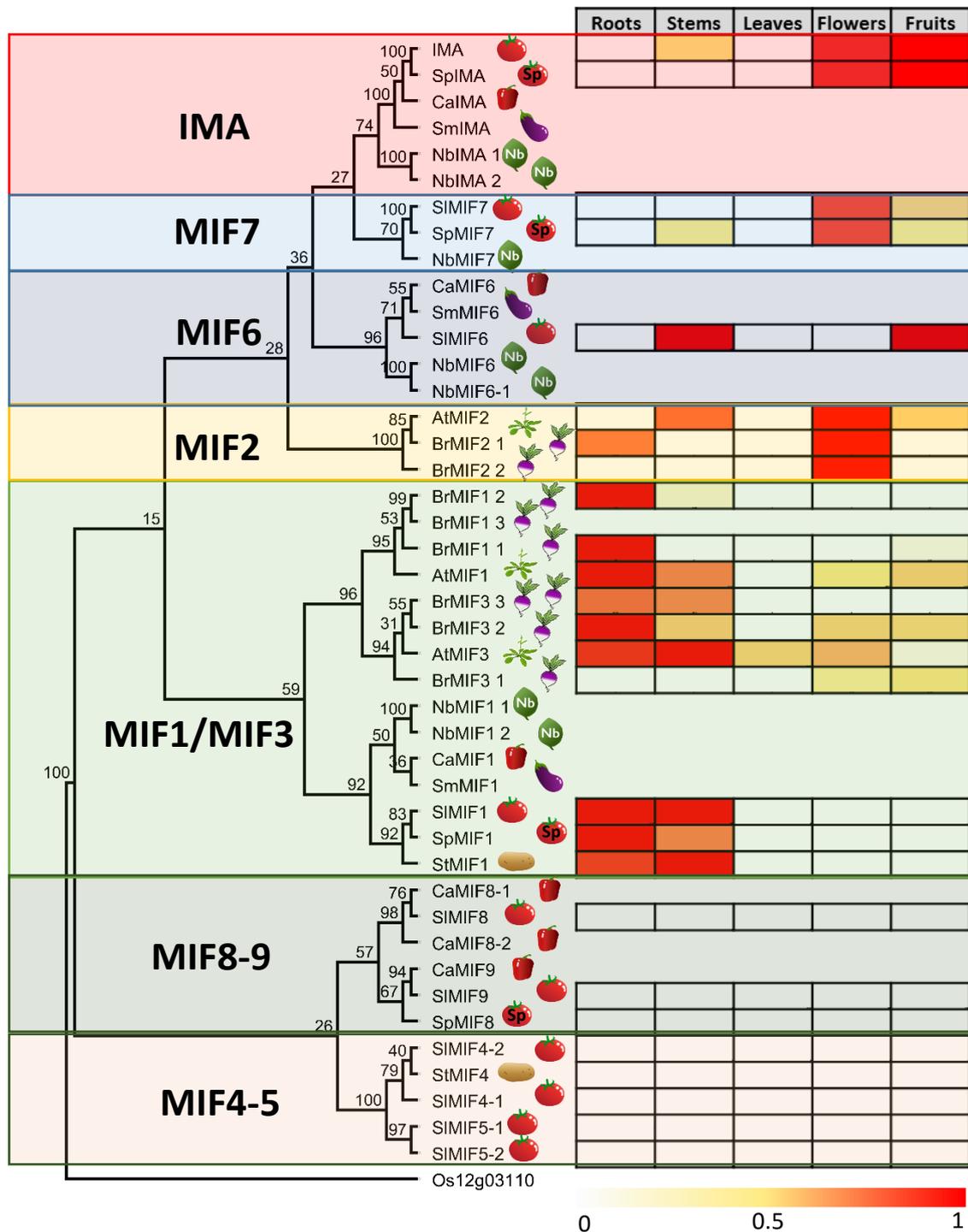


Figure 68: Neighbor-joining tree and expression level analysis between MIF sequences from Brassicaceae and Solanaceae species.

The neighbor joining tree was created using Geneious® software resulting from 1000 bootstrap replicates. The numbers show bootstrap confidence levels for each node.

The heatmap representation indicates relative expression levels for the different organs considered for each genes. The bar at the bottom of the heat map represents relative expression values.

Sl : *Solanum lycopersicum*, Sp : *Solanum pennellii*, Nb : *Nicotiana benthamiana*, Br : *Brassica rapa*, St : *Solanum tuberosum*, Ca : *Capsicum anuum*, Sm : *Solanum melongena*, Os : *Oryza sativa*.

Solanaceae MIF1/MIF3 occurred before the recent duplication of MIF1 and MIF3 in *Brassicaceae*. MIF2 and *brassicaceae* homologs form a specific subgroup with genes expressed in flowers. The four other subgroups are specific of *Solanaceae* species. IMA, fruit expressed genes in tomato and *S. penellii*, belongs to a phylogenetic subgroup with its homologs, but the lack of information about the expression of the other genes then hampers to conclude about the fruit-specific expression within this subgroup. MIF7 and MIF6 homologs form two subgroups expressed in flower and stem/fruit respectively. The two last subgroups (MIF4-5 and MIF8-9) are distantly related to the others. Interestingly, sequence alignments between proteins of these subgroups and ZHD proteins revealed a higher proximity than with other MIF proteins, suggesting that these genes came probably from a recent duplication of several ZHD in *Solanaceae*. The absence of any HD-related sequences following the ZF domain in their genomic sequence suggests a deletion that occurred after the duplication.

To confirm and precise these expression data, transcripts levels of SIMIF6 (Solyc02g067330) and SIMIF7 (Solyc03g061620) which are close relative to the already described IMA, were assessed during floral and fruit development by real-time RT-qPCR analyses (**figure 69**). As expected, the expressions of these genes were only detected in flowers and fruits. SIMIF6 expression was detected at a very low level in young floral buds but its expression level increased from stage 9 to anthesis and remained high and constant during fruit development. SIMIF7 expression began before stage 3 of floral development and increased strongly during the first stages of floral development to reach a maximum at stages 9-12. Its expression then decreased after anthesis but was still expressed during fruit development.

The superposition of these MIF gene expression patterns suggesting functional redundancies and the ability that MIF proteins can homodimerize led us to hypothesize that the putative MIF functions require interactions between MIF family members. Prior to perform an in-depth protein/protein interaction analysis, we aimed at characterizing their protein sequences in order to highlight some specific features.

MIF protein features

As already described (**Hu and Ma, 2008**), MIF proteins share not only a high level of conservation at the Zinc Finger domain but also at their C-terminal and N-terminal parts. As

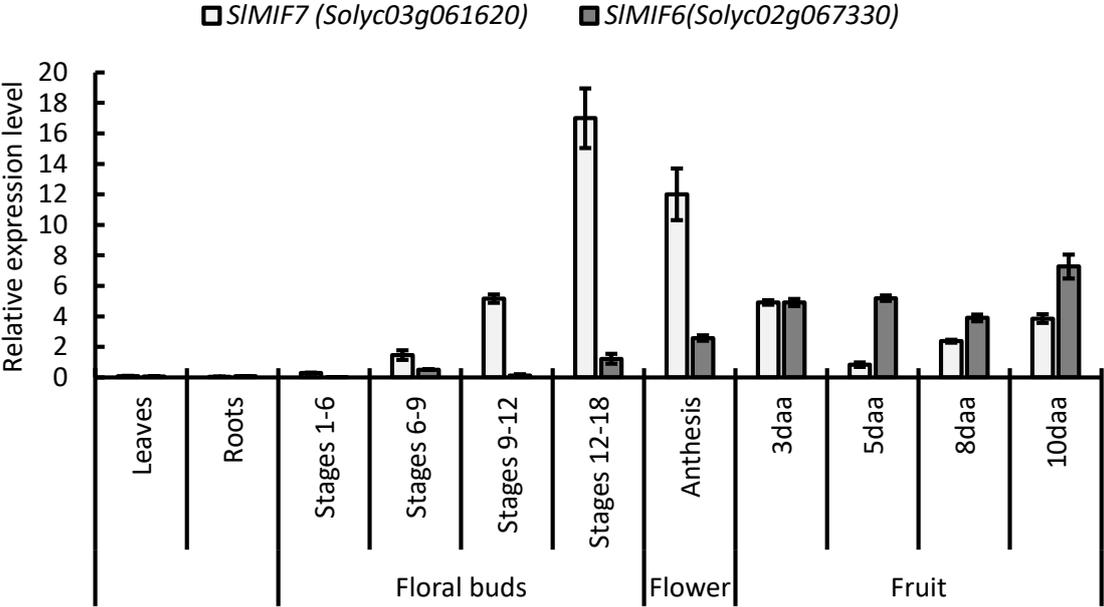


Figure 69: SIMIF7 (Solyc03g061620) and SIMIF6 (Solyc02g067330) are flower- and fruit-specific genes respectively.

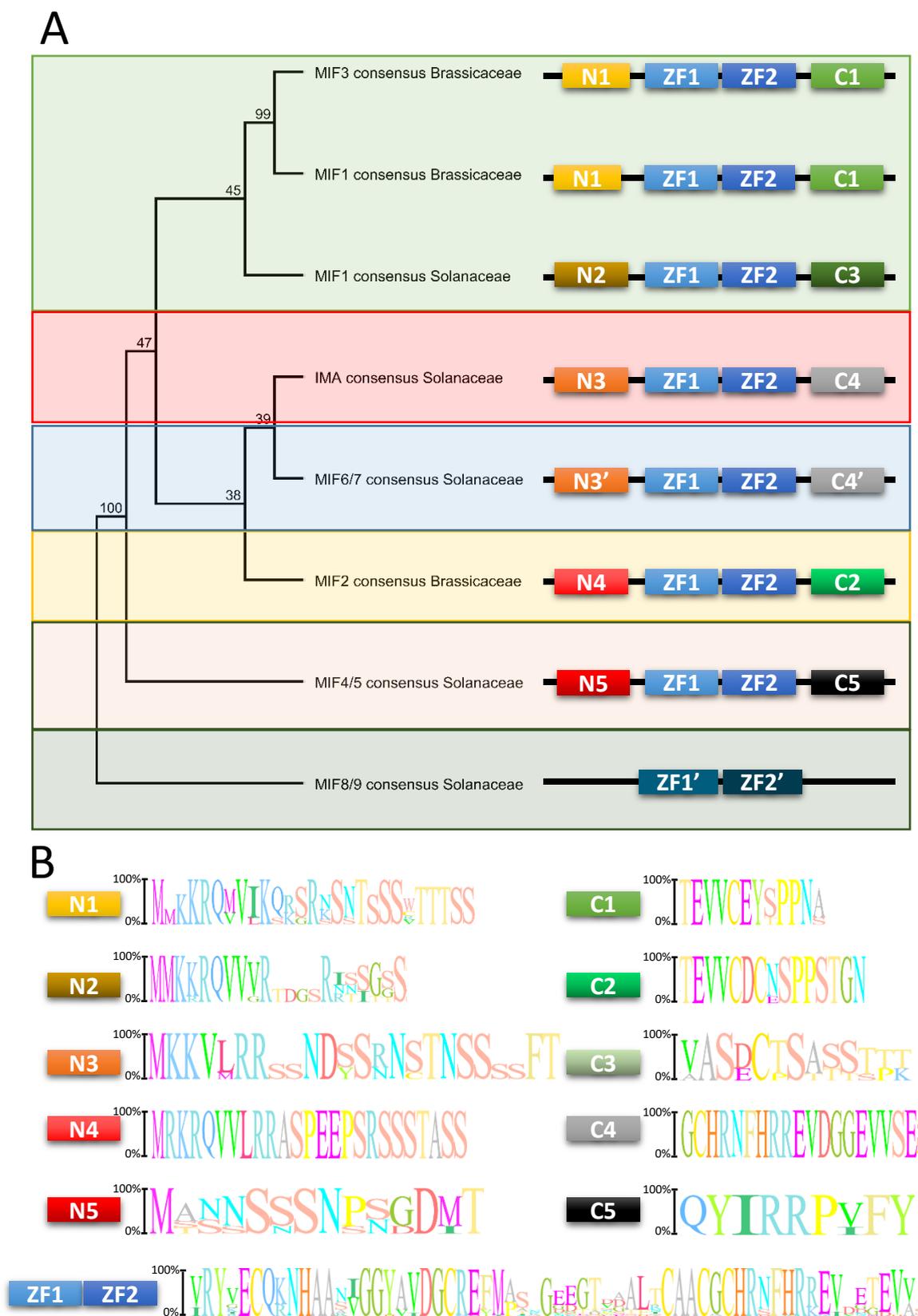
The expression analysis was performed using wild type Tomato leaves, roots, pooled floral buds at various stages (1-6, 6-9, 9-12 and 12-18), flowers and fruit at various stages by real time quantitative PCR.

Error bars indicate SD of three biological replicates.

daa, days after anthesis.

reported before (**Hu, Ma and De Pamphilis, 2008**), sequence alignments of MIF homologs revealed a common sequence within the N-terminal part, namely (K/R)₃Q(V/I/L)₃(R/K)₂, in eudicots, whereas nearly all homologs from monocots display a GPQ₂DRS motif (**Hu et al., 2008**). These sequence features outside the ZF domain might be crucial for functional distinction of MIF homologs within and between species. Using the Surveyed conserved motif ALignment diagram and the Associating Dendrogram (SALAD) database, an analysis of the motif conservation was performed in order to see whether each subgroup shares the common presence or absence of additional conserved motifs. Interestingly, at the exception of the MIF8/9 subgroup displaying an altered zinc finger domain, all zinc finger domains of MIF homologs shared a very high level of identity and differed only in their C-terminal and N-terminal motifs (**figure 70A**). One of the most interesting features in these motifs was the presence of conserved serine and threonine residues that might be potential phosphorylation or glycosylation sites (**figure 70B**).

To gain insights into the characterization of these regions, in a context of structure–function studies, we analyzed the amino-acid composition of MIF proteins using different tools for protein biochemical analysis and structure predictors (the very different MIF4/5 clade was excluded from the analysis). The sequence alignment of the analyzed Tomato and *A. thaliana* MIF proteins is shown in **figure 71**. The amino-acid composition and Hydrophobic Cluster Analysis (HCA) showed that despite their variability in length and sequences, all MIF N-termini sequences contained numerous positively charged (R,K) and polar or phosphorylatable (N, S, T) residues (**figure 72**). From residue positions 25 to 45 the protein sequence is composed of hydrophobic residues and apolar clusters, suggesting that this protein region is inaccessible and next, that the zinc finger domain is structured around three cysteine and 5 histidine residues (**figure 72**). The C-terminus motif also contained several phosphorylatable residues and sometimes surnumerary cysteine residues which could be involved in disulfide bond formation.



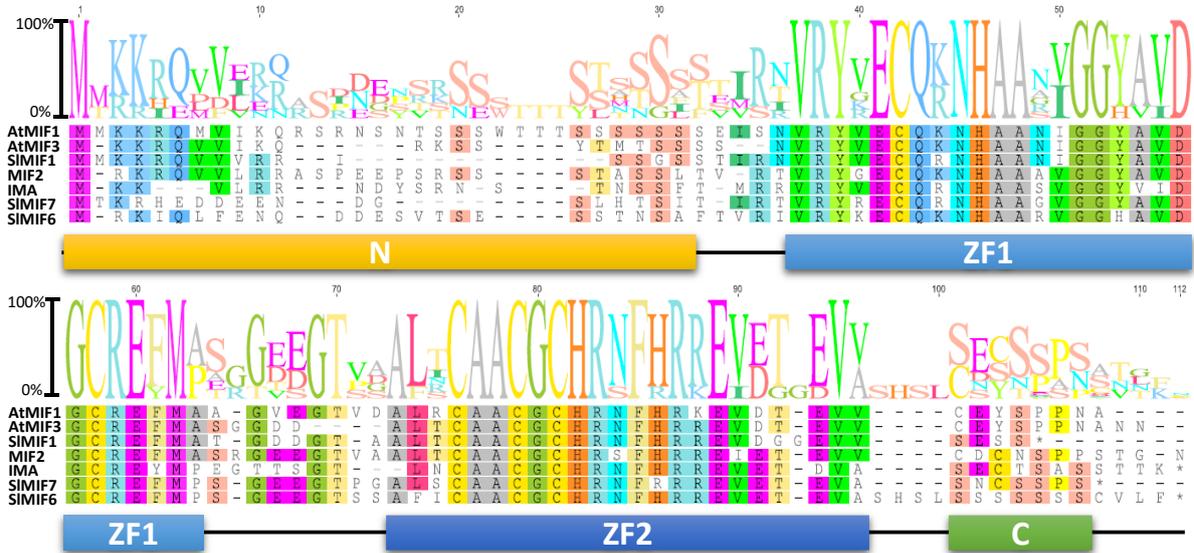


Figure 71: Analysis of *A. thaliana* and Tomato MIF proteins.

Alignments between the three *A. thaliana* MIF sequences and the three *S. lycopersicum* MIF homologous sequences. Gaps are introduced to maximize the alignments; identical and similar residues are colored. Amino-acid conservation is indicated above the alignments.

A schematic representation of conserved domain location is indicated under the alignments.

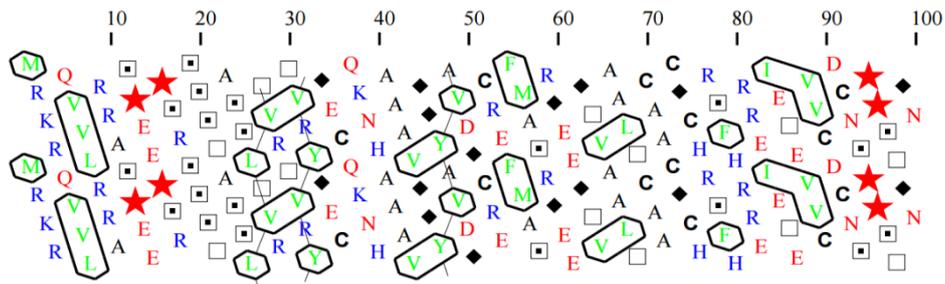


Figure 72: Prediction of secondary structure of MIF2 protein using HCA analysis

HCA plot was made using the MIF2 protein sequence in the Mobyle webserver (Callebaut *et al.*, 1997).

Green clusters are associated with apolar amino-acids; blue font correspond to polar amino-acids; red star is for proline; diamond is for glycine; squares with a point or without are for serine or threonine, respectively.

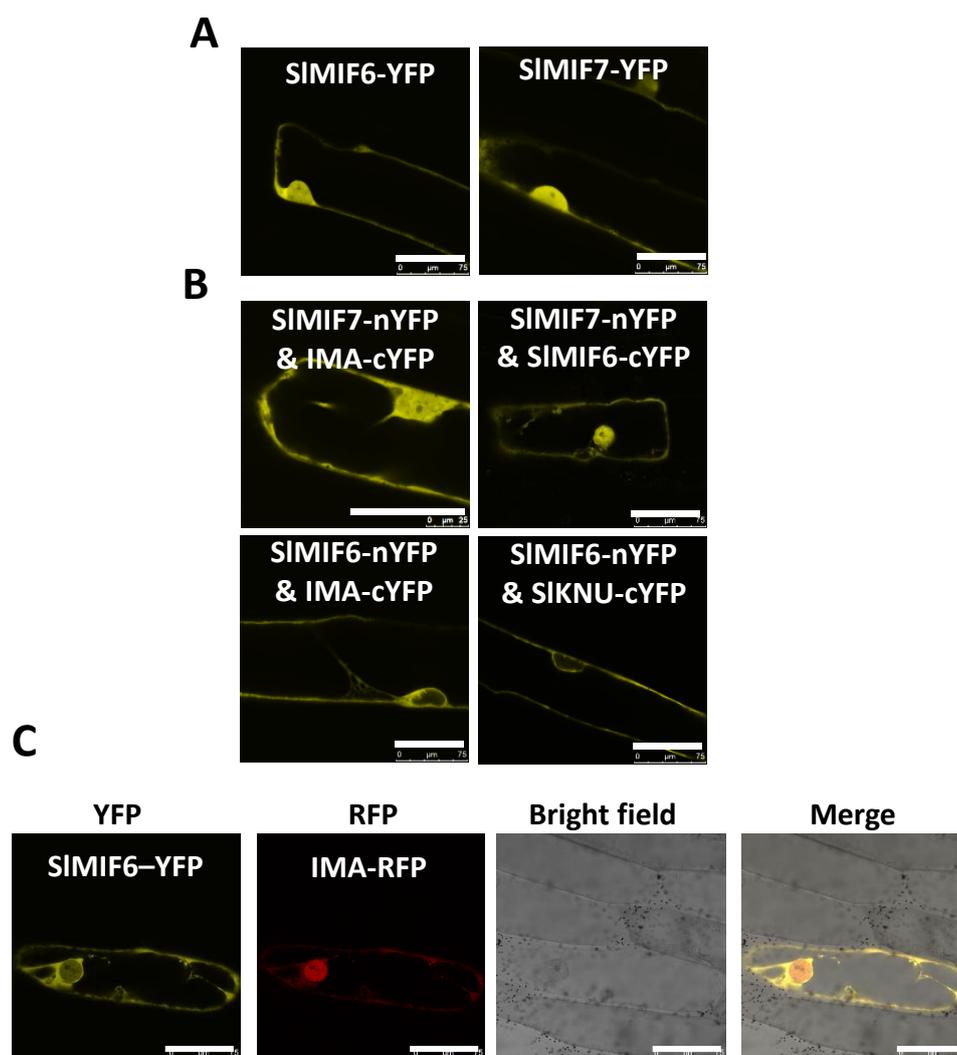


Figure 73: Subcellular localizations and protein/protein interactions between Tomato MIF proteins and SIKNU.

- (A) Subcellular localizations in onion epidermal cells of SIMIF6-YFP and SIMIF7-YFP
- (B) BiFC analysis in onion epidermal cells of the interactions between IMA, SIKNU, SIMIF6-YFP and SIMIF7-YFP
- (C) Subcellular colocalizations in onion epidermal cells between SIMIF6-YFP and IMA-RFP.

Subcellular localization and protein/protein interaction of Tomato MIF proteins

To examine whether SIMIF6, SIMIF7 and IMA are able to interact together, we performed BiFC experiments in a heterologous system using onion epidermal cells. As a prerequisite, we analyzed the subcellular localization of each protein, and demonstrated that SIMIF6 and SIMIF7 were localized both in the nucleus and the cytoplasm (**figure 73A**). Interestingly, BiFC experiments revealed the ability of SIMIF6 and SIMIF7 to interact with IMA and together as well, but the localization of the BiFC signals was shown to be different (**figure 73B**). The interaction between IMA and SIMIF7 occurred in both the cytoplasm and the nucleus, alike as the interaction between SIMIF6 and SIMIF7, but the interaction between IMA and SIMIF6 occurred only within the cytoplasm. Co-localization experiments of SIMIF6-YFP and IMA-RFP revealed that SIMIF6 was localized outside of the nucleus in the presence of IMA which was still detected in both the nucleus and cytoplasm (**figure 73C**). This observation thus suggests that SIMIF6 was excluded out of the nucleus and that the two proteins were only present in the cytoplasm. Then, interaction analysis between SIMIF6, SIMIF7 and the C₂H₂ partner of IMA was assessed in order to determine the conservation of the interaction. BiFC experiments revealed the ability of SIMIF6 to interact with SIKNUCKLES but the signal was observed mostly in the cytoplasm (**figure 73B**), which is not the localization of SIKNU when expressed alone, suggesting that SIMIF6 is involved in the retention of SIKNUCKLES outside of the nucleus. Concerning SIMIF7, no interaction with SIKNU could be observed in BiFC suggesting that the two proteins do not interact together.

Whether the specificity of the protein-protein interactions rely the structural features of MIF proteins still remains to be determined.

MIF homodimerization involves both the Zinc Finger domain and the N-terminus

It was previously described that MIF proteins interact specifically with other members of the ZHD family through their zinc-finger domains (**Hong et al., 2010**), but also that a truncated version of the IMA protein was able to interact with the native form of IMA (**Bollier et al., submitted**). We then wanted to address whether the different parts of the MIF proteins could

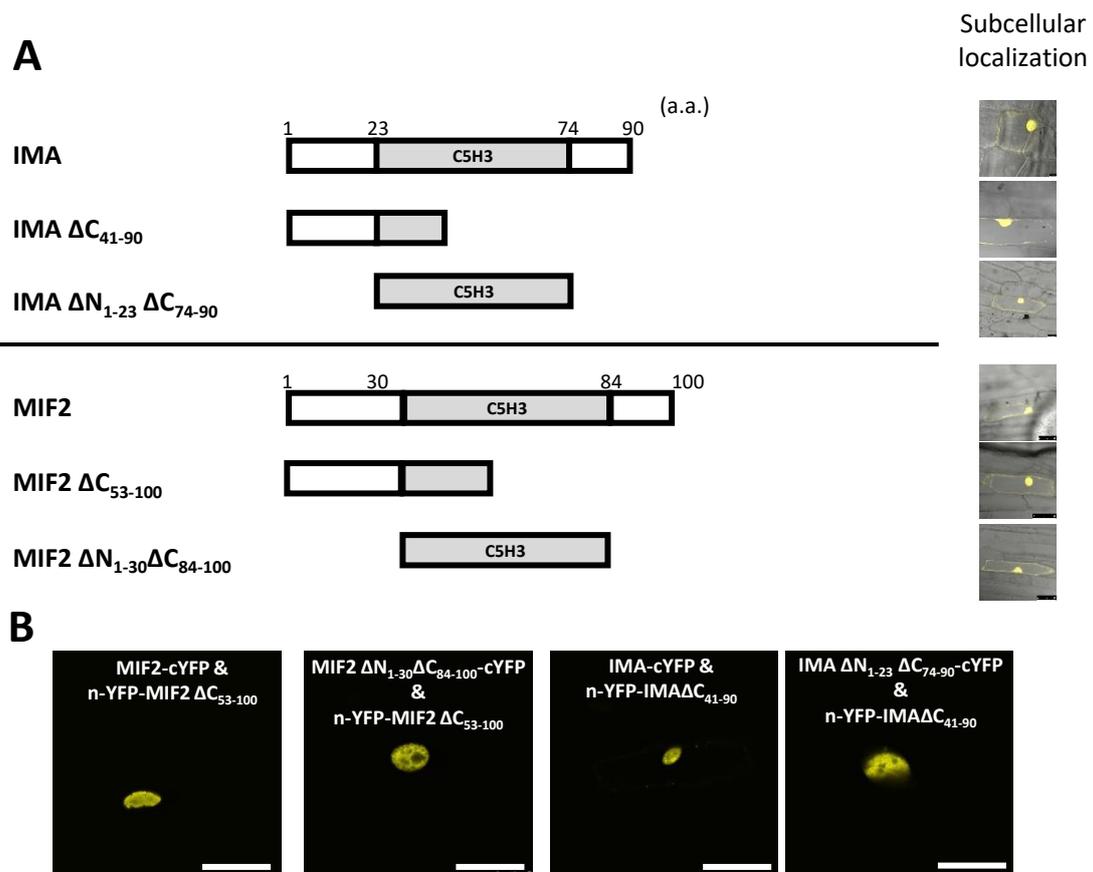


Figure 74: Characterization of the domain involved in IMA/MIF2 homodimerization.

- (A) Schematic view and subcellular localizations in onion epidermal cells of a series of MIF2 and IMA deletion variants. Grey boxes correspond to conserved motifs.
- (B) BiFC analyses in onion epidermal cells of the interactions between MIF2 and IMA deletion variants. Bars, 50 μ m.

be important for the specificity of the interaction. To better map the interacting domains, we first produced a series of truncated IMA/MIF2 protein versions (**figure 74A**). We then analyzed their subcellular localization and tested the interaction between them and with full length sequences using the BiFC approach (**figure 74B**). All truncated forms of IMA or MIF2 proteins localized in both the nucleus and the cytoplasm (**figure 74A**). The full-length IMA and MIF2 proteins could homodimerize in our system and we tested their ability to interact with their truncated versions. BiFC analyzes revealed that IMA and MIF2 could bind to their C-terminal truncated version, namely IMA Δ C₄₁₋₉₀ and MIF2 Δ C₅₃₋₁₀₀ respectively, which contained only the N-terminal part of the ZF motif; in addition they could also interact with the truncated IMA Δ N₁₋₂₃ Δ C₇₄₋₉₀ and MIF2 Δ N₁₋₃₀ Δ C₈₄₋₁₀₀ forms containing solely the ZF motifs (**figure 74B**). Despite their ability to interact with full-length IMA and MIF2, neither IMA Δ C₄₁₋₉₀ and MIF2 Δ C₅₃₋₁₀₀ or IMA Δ N₁₋₂₃ Δ C₇₄₋₉₀ and MIF2 Δ N₁₋₃₀ Δ C₈₄₋₁₀₀ truncated proteins could homodimerize. Furthermore IMA Δ N₁₋₂₃ Δ C₇₄₋₉₀ and MIF2 Δ N₁₋₃₀ Δ C₈₄₋₁₀₀ could interact with IMA Δ C₄₁₋₉₀ and MIF2 Δ C₅₃₋₁₀₀ (**figure 74B**), suggesting that one complete zinc finger domain is necessary and sufficient to bind the N-terminal domain of another MIF protein.

The N-terminal domain of SIKNU/KNU is required for IMA/MIF2 interaction

We previously reported the interaction between MIF proteins and other zinc finger proteins such as the C₂H₂ zinc-finger protein KNUCKLES. In addition, we demonstrated that the KNU C-terminal EAR-domain was not required for its interaction with IMA or MIF2 (**Bollier et al., submitted**). Our previous results suggested that IMA or MIF2 interacts with another parts of a protein than the zinc finger domain. Hence we aimed at determining which part of the protein is involved in the interaction. The subcellular localization analysis of truncated KNU and SIKNU proteins revealed the role of the C₂H₂ zinc-finger domain and its immediate surrounding region, since when removed it resulted in a nucleo-cytoplasmic localization of the protein, while when present it allowed the nuclear localization of the protein (**figure 75A**). These observations are consistent with previous C1-1i C₂H₂ zinc-finger protein characterization suggesting that the N-terminal cluster of basic amino-acids before the C₂H₂ domain plays the role of nuclear-localization signal (**Isernia et al., 2003**).

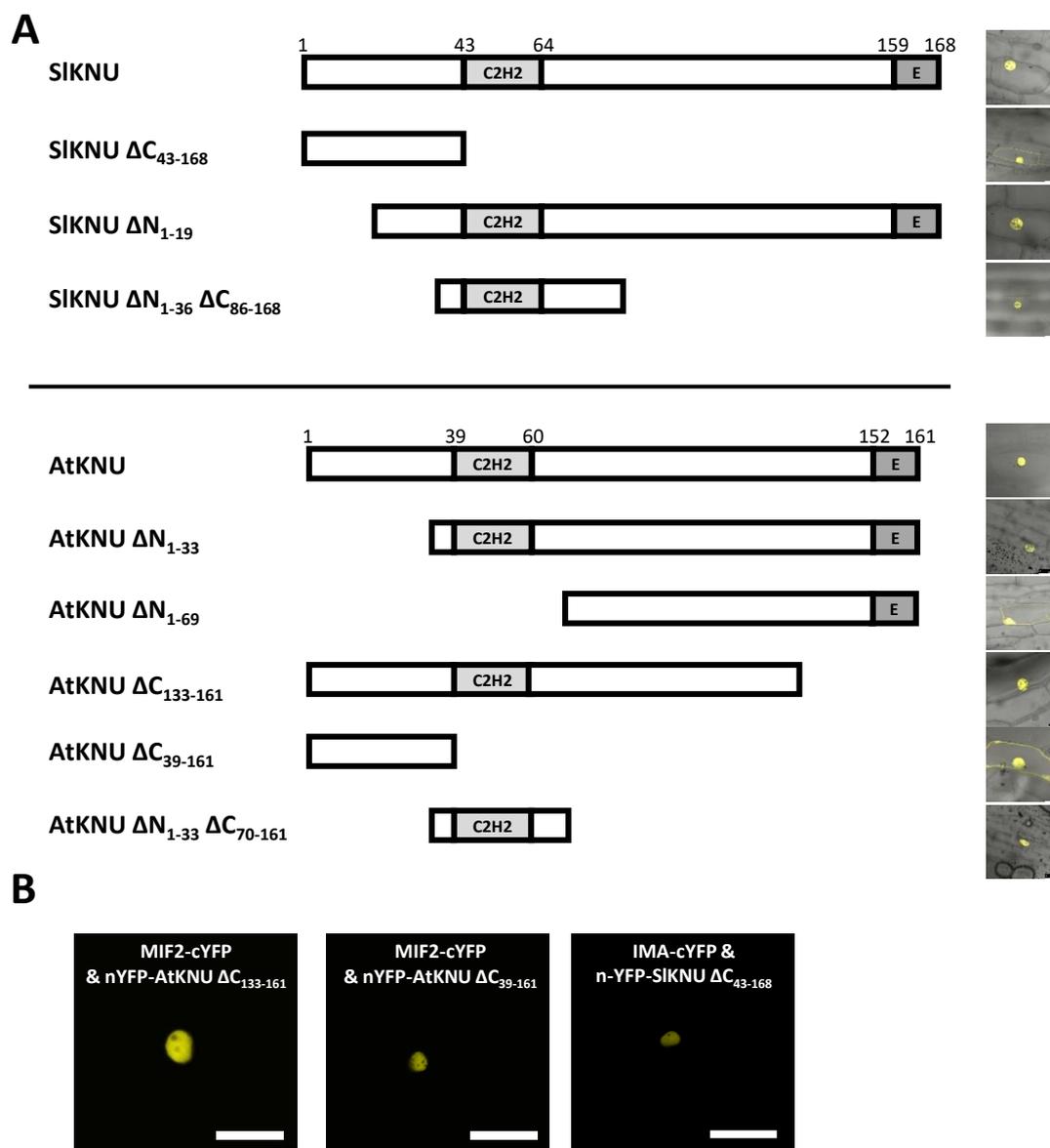


Figure 75: Characterization of the domain involved in the interaction between IMA/MIF2 and KNU/SIKNU

- (A) Schematic view and subcellular localizations in onion epidermal cells of a series of KNU and SIKNU deletion variants. Grey boxes correspond to conserved motifs.
- (B) BiFC analysis in onion epidermal cells of the interaction between IMA/MIF2 and KNU/SIKNU deletions variants. Bars, 50 μ m.

Interestingly, IMA and MIF2 could interact with SIKNU Δ C₄₃₋₁₆₈ and AtKNU Δ C₃₉₋₁₆₁ truncated forms respectively (**figure 75B**), but not with any of the N-terminal-truncated forms of SIKNU and AtKNU, thus suggesting that IMA or MIF2 proteins interact only with the N-terminal part of SIKNU and AtKNU respectively. Furthermore, the interaction of IMA Δ C₄₁₋₉₀ and MIF2 Δ C₅₃₋₁₀₀ truncated forms with SIKNU and KNU respectively, was also tested and did not lead to any interaction. These results suggest that the ability of IMA or MIF2 proteins to interact with SIKNU or KNU proteins is linked to the C₃H₅ zinc-finger domain of MIF proteins. Interestingly the interactions took place in the nucleus whatever the nucleo-cytoplasmic localizations of the full-length or truncated forms of IMA and MIF2 were. Altogether these results underline that IMA or MIF2 protein interactions involve its ZF domains.

The N- and C-terminal regions of tomato and A. thaliana MIF proteins are intrinsically disordered

The alignment of the MIF proteins showed that outside of the ZF domain, the N- (1-36) and C-terminal (96-107) regions are composed of conserved motifs among the MIF proteins containing numerous serine and threonine residues at both N- and C-termini that might be sites for phosphorylation or glycosylation processes (**figure 71**).

In order to compare the different profiles of MIF protein disorders in all *A. thaliana* and tomato MIF homologs, the PONDR-FIT meta predictor tool was used because of its high level of efficiency in case of partially disordered proteins. This analysis showed that MIF proteins display a high level of disorder in both their N- and C-terminal parts and a less disordered central part corresponding to the ZF domain (**figure 76**). These results were further confirmed using other disorder predictor tools through the metaserver MeDor (**Lieutaud et al., 2008**). The strong conservation of the disorder in both N- and C-terminal parts of the proteins despite their sequence diversity and the involvement of the N-terminal domains in the interactions between MIF proteins suggests a role of these disordered protein regions in the putative MIF functions.

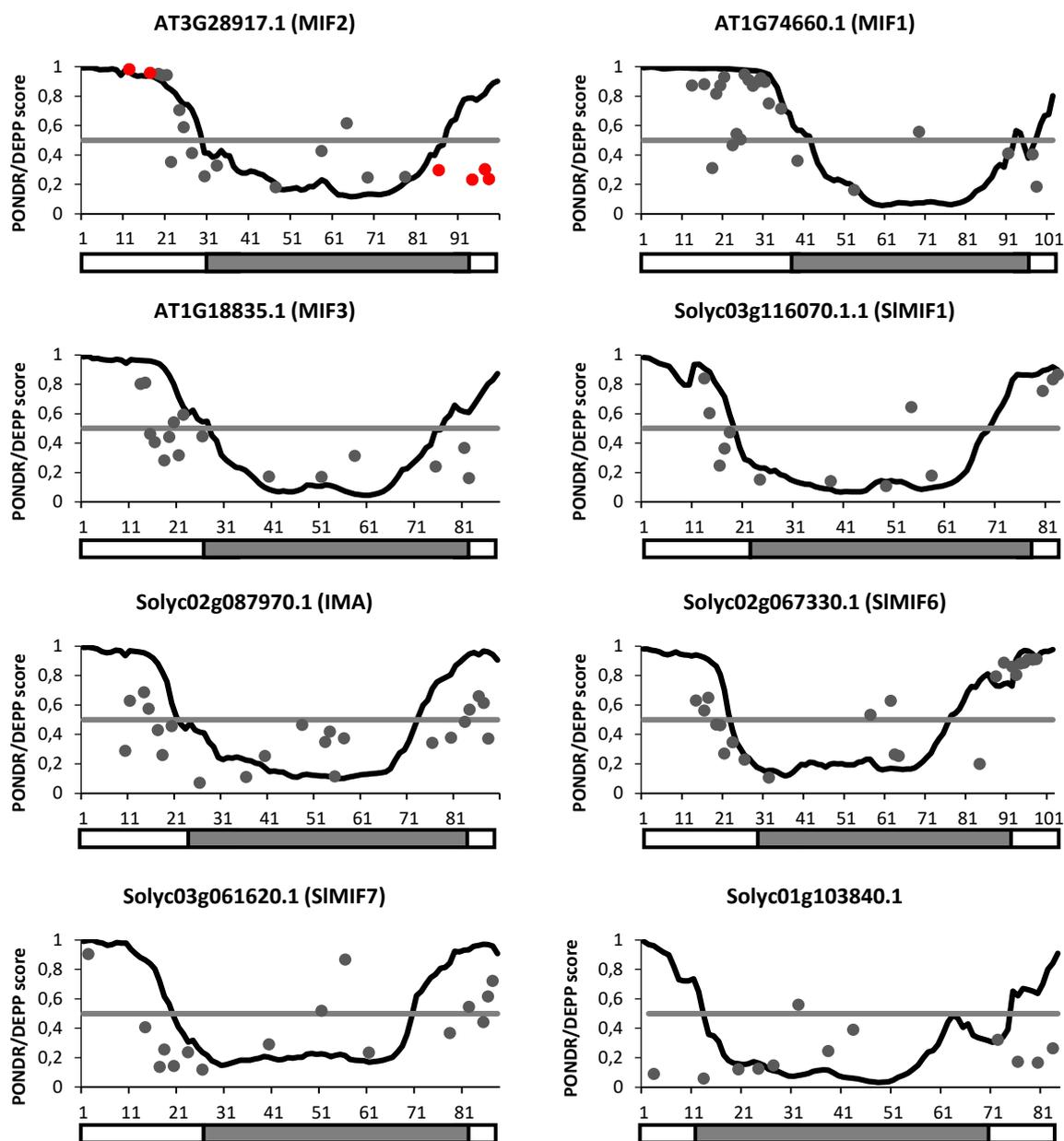


Figure 76: The N- and C-terminal region of *A. thaliana* and tomato MIF protein are disordered.

Grey circles represent predicted phosphorylation sites obtained using the DEPP predictor.

Red circles represent phosphorylated residues found in different phosphoproteomic studies.

Grey and white boxes under the plots indicate zinc-finger domain and the N- and C-terminal regions, respectively.

Disorder prediction for Tomato and *Arabidopsis* MIF proteins was performed using the POND-FIT algorithm.

IMA and MIF2 proteins display phosphorylatable N-termini

As the N-terminal part of all MIF proteins in *A. thaliana* and tomato contain phosphorylatable residues, we used the DEPP (Disorder Enhanced Phosphorylation Predictor) to predict potential phosphorylatable amino-acids within the protein sequences. This analysis was compared with the disorder profile and showed a strong colocalization between phosphorylation site prediction and high level of disorder (**figure 76**). These predictions were supported by several phosphoproteomics analyses made on different conditions in *A. thaliana* using PhosPhat4.0 (**Durek et al. 2015**). **Roitinger et al. (2015)** and **Meyer et al. (2012)** performed phosphoproteomic analyses on *A. thaliana* seed and on rosette leaves respectively. Both analyses revealed the presence of phosphorylated peptides corresponding to the C-terminus and to the N-terminus of the MIF2 protein. These results suggested a differential phosphorylation status depending on the tissue or developmental stages and could be linked to the function of MIF and ZHD proteins. Altogether these results also suggest a possible role of the disorder in the accessibility of the N- and C-termini to a protein kinase which may change the phosphorylation status in order to modify MIF protein ability to interact with different partners.

The phosphorylation status of IMA and MIF2 proteins affects protein-protein interaction and nuclear localization

To investigate the potential effects of phosphorylation on IMA/MIF2 ability to homodimerize or to interact with SIKNU/KNU, several phosphoablative (replacement of serine by alanine) and phosphomimetic (replacement of serine by aspartate) variants of IMA and MIF2 were created and used to assess the possible impact of phosphorylation within the N-terminal domain in the subcellular localization and protein/protein interactions using the BiFC technique (**figure 77**).

Our previous work showed that the IMA-YFP and MIF2-YFP displayed a nucleo-cytoplasmic localization of the YFP signal with high fluorescence levels in the nucleus (**figure 77A**). Phosphomimetic variants of MIF2 and IMA fused to the YFP displayed a similar subnuclear localization than the native sequences with high accumulation inside the nucleus (**figure 77A**). Interestingly phosphoablative variants of both proteins had a cytoplasmic localization with

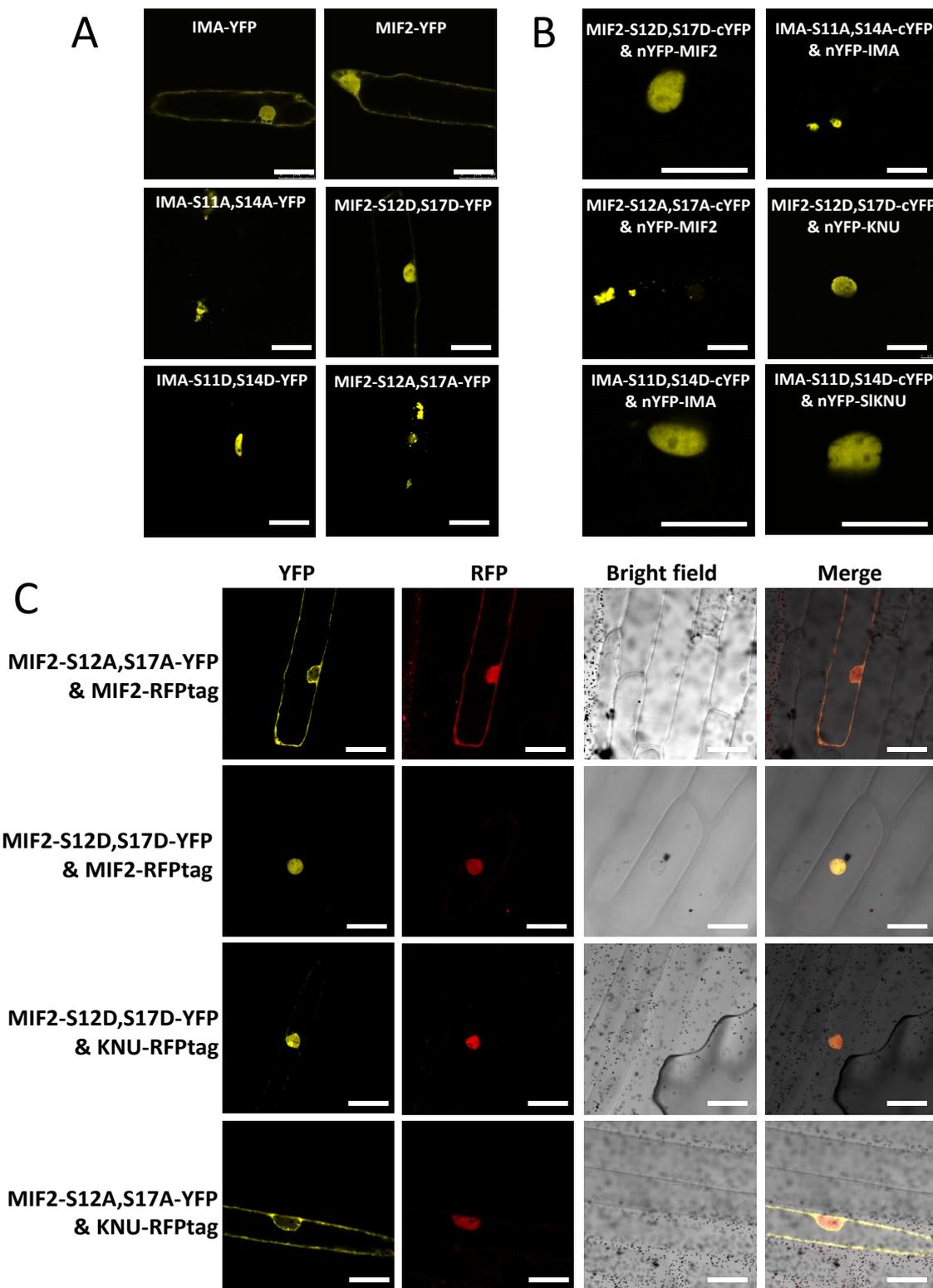


Figure 77: Phosphorylation of IMA and MIF2 protein is necessary to the nuclear localization and interaction with SIKNU/AtKNU protein.

(A) Subcellular localizations in onion epidermal cells of IMA/MIF2 and their phosphoablative/phosphomimetic variants.

(B) BiFC analyses of the interactions between IMA/MIF2 phosphoablative and phosphomimetic variants and IMA/MIF2 and AtKNU/SIKNU.

(C) Subcellular co-localizations in onion epidermal cells of MIF2 phosphoablative/phosphomimetic variants and its native form or KNU.

Bar, 25 μ m.

accumulation in uncharacterized cytoplasmic aggregates that can be observed in more than 50% of YFP-positive cells (**figure 77A**). These results suggest that phosphorylation of the serine residues in the N-termini of both IMA and MIF2 is necessary to their nuclear localization. In fact the replacement of the two first serine residues in both sequences was enough to exclude IMA and MIF2 out of the nucleus. Interestingly, the replacement of the five or seven serine residues in MIF2 and IMA respectively led to the same results than the replacement of the only two serine (positions 12 and 17 for MIF2 and 11 and 14 for IMA) residues, suggesting that the phosphorylation of these two serine residues is enough to modify the protein structure.

To examine whether the phosphorylation status of IMA and MIF2 impacts also their ability to interact with their partners, we analyzed the interactions of the phosphoablative and phosphomimetic variants with their native IMA and MIF2 counterparts and with SIKNU and KNU using BiFC (**figure 77B**). IMA and MIF2 phosphomimetic variants were able to interact together and the native IMA and MIF2 proteins was nuclearly localized alike the native homodimer. Interestingly the same result was obtained for the interaction between phosphomimetic proteins and SIKNU and KNU proteins, confirming that phosphomimetic residues do not alter and even could allow IMA and MIF2 to localize in the nucleus and to interact with their partners. In contrast, the interaction between phosphoablative proteins and native IMA and MIF2 proteins was localized in cytoplasmic aggregates indicating that IMA and MIF2 native proteins are still able to interact with their phosphoablative variants. Because of the cytoplasmic localization of the variants, the interaction only took place in the cytoplasm (**figure 77B**). We could not detect any BiFC signal when we tested the interaction between phosphoablative variants of IMA or MIF2 and SIKNU and KNU proteins respectively, suggesting that these proteins are unable to interact together. We hypothesized that these results are due to the difference of localization between the phosphoablative variants (cytoplasm) and KNU/SIKNU (nucleus). Experiments aimed at studying the colocalizations of MIF2 phospho-modified proteins confirmed that the phosphoablative form is strictly localized out of the nucleus even in presence of the KNU or MIF2 native proteins and that the phosphomimetic protein is still nuclearly localized in both conditions (**figure 77C**).

To summarize, these results suggest that the phosphorylation process modulates the ability of IMA or MIF2 proteins to interact with their protein partners probably through a nuclear-cytoplasmic shuttle, or a structural modification altering the ability of interactions with the protein partners. The ability of the native IMA or MIF2 proteins to interact with phosphoablative variants confirmed the difference of interaction mechanism as demonstrated with truncated variants.

Conclusion

Intrinsically disordered regions are crucial for the biological functions of numerous proteins (**Dyson *et al.*, 2005**). As one of the most abundant post-translational modifications in eukaryotic proteins (**Hunter, 2007**), phosphorylation is a key event occurring predominantly within intrinsically disordered protein regions. However, only a few plant protein functions have been associated with their Intrinsic disorder (ID).

Plant-specific MIF proteins have been proposed to function as adaptor proteins regulating transcription factor activities (**Bollier *et al.*, submitted**). The ability of MIF proteins to interact with transcription factors and to modify their subcellular localization supports this proposition. Here, using both MIF2 from *A. thaliana* and IMA from tomato, we demonstrated experimentally that MIF2 or IMA interacts with the N-terminal region of other MIF proteins or with one of their protein partners, namely the C₂H₂ transcription factor KNUCKLES, via the C₃H₅ zinc-finger domain.

An important functional advantage over structurally ordered proteins is that intrinsically disordered regions can bind a number of partners with high specificity and low affinity (**Dyson *et al.*, 2005**). A potential molecular recognition feature is located in the disordered N-terminal region of MIF2 or IMA protein as indicated by their disorder profile (**figure 76**). Furthermore, the conservation of the disorder profile in *A. thaliana* and tomato MIF proteins despite their primary sequences differences, suggests an important role of this domain in their function. Moreover, this intrinsic disorder is associated with the presence of conserved phosphorylatable amino-acids and could play a role for the accessibility to protein kinase.

Such a hypothesis is supported by the alteration of both nuclear localization and interaction ability of phosphomimetic and phosphoablative variants of MIF2 or IMA, suggesting that

phosphorylation of IMA or MIF2 in their ID N-terminal domain could be a mechanism for controlling their localization and interaction ability with nuclear proteins. These data are in accordance with previous reports (**Chrvia *et al.* 1993, Bustos *et al.* 2006**) describing that phosphorylation in ID regions often mediates protein interactions or protein relocalization into or outside the nucleus to fine-tune protein activities.

Altogether these results suggest that MIF2 or IMA functions during plant development is specified by at least two complementary mechanisms: (i) a specific expression territory allowing their actions in specific tissues, and (ii) a precise subcellular localization of the MIF-target protein interactions that depend on the MIF phosphorylation status and consequently on the ID.

Complementary results

MIF2 subcellular localization

Another interesting observation about MIF2 subcellular localizations is the wide range of structures where MIF2 is present. Depending on different parameters, protein partners or hormonal treatments, MIF2 could be localized according to a diffuse pattern in the cytoplasm and the nucleus, concentrated into nuclear bodies or in cytoplasm agglomerates. Because the overexpression of tagged-protein could result in non-physiological aggregation of proteins present in excess, these different kind of structures are often not commented at all or misinterpreted leading to poor informations about their role(s) and their edification(s).

MIF2 is localized in specific nuclear bodies named clastosomes

As the most special localization of MIF2 protein, nuclear bodies seem to be of particular interest. Because numerous plant nuclear bodies were described to date (for a review see **Shaw *et al.*, 2004**), more data were needed to determine the type of nuclear bodies in which MIF2 protein localizes.

Because similar nuclear structures were described in 2005 by Tao *et al.*, as proteolytically active nuclear bodies involved in auxin regulation (**Tao *et al.*, 2005**), J. Leblond in 2011 performed co-localization experiments of MIF2-YFP transformed cells with other proteins under auxin treatments in order to determine which other proteins are present with MIF2 in these structures. In MIF2-YFP overexpressing cells, these structures were over-represented after auxin treatment when IAA17, the COP9-signalosome CSN5 or CSN3 subunits, the SCF-complex CUL1 subunit or the proteasome PAA1 or PBB subunits were over-expressed in the same cells. As MIF2 is an interactor of the COP9-signalosome CSN5 subunit, it was hypothesized that MIF2 protein colocalizes in these structures because of its interaction with CSN5 leading to the CSN5 inactivation.

These structures were named clastosomes (from the greek word *klastos*, broken and *soma*, bodies) in 2002 by Lafarga *et al.* who described the clastosomes as nuclear bodies containing a high concentration of ubiquitin-conjugated proteolytically active 20S core, 19S regulatory complexes of the 26S proteasome and protein substrates of the proteasome (**Lafarga *et al.*,**

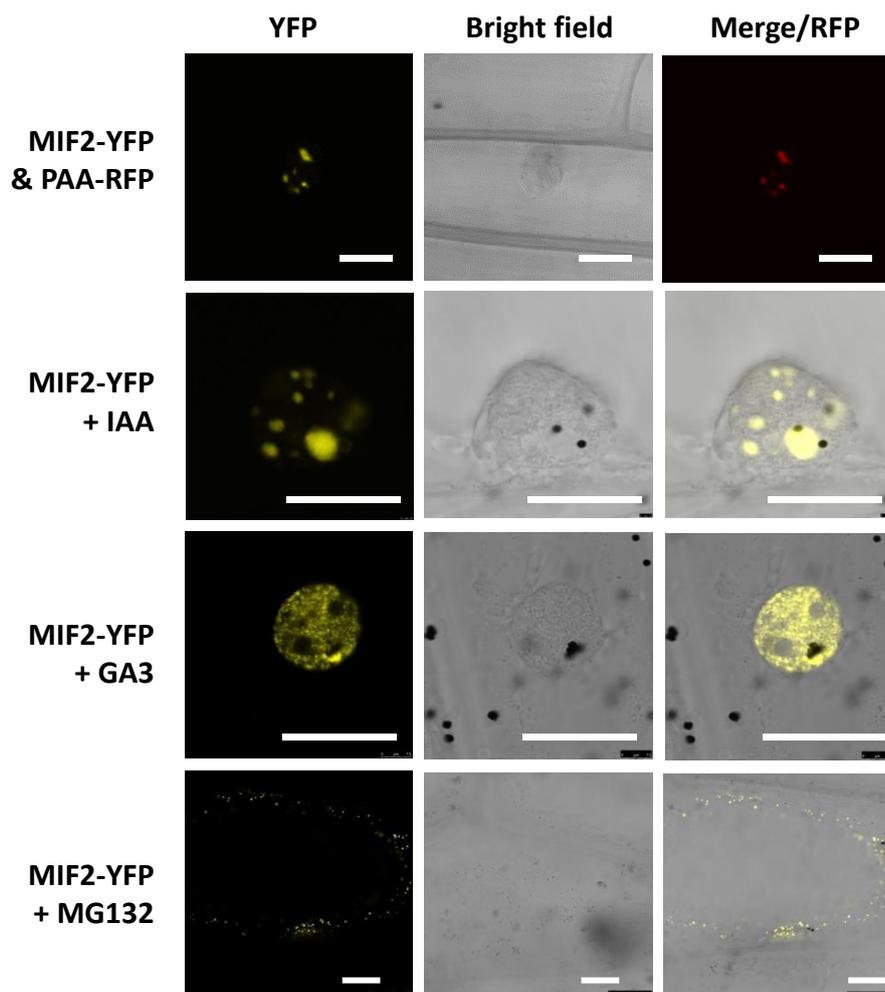


Figure 78: MIF2 is localized in clastosomes and their shape is altered by MG132 or hormonal treatments.

Prior observation, onion epidermis were incubated with 10 μ M of indole acetic acid (IAA), 10 μ M of gibberrellic acid (GA3), or with 100M of MG132 Bar, 25 μ m.

2002). These structures are rare under normal conditions but their assembly under stress or hormonal stimulation suggests a role in multiple signaling pathways response. Numerous studies report the formation of clastosomes following hormone-related protein over-expressions. I have already mentioned the case of IAA17 concerning auxin response. In 2004 Ng *et al.*, reported the effect of ABA for the subnuclear reorganization in guard cells indicating localization of AtKIP1 in clastosomes following ABA treatment (**Ng *et al.*, 2004**). More recently CROWDED NUCLEI protein was reported to be localized in clastosomes confirming their formation upon ABA treatment (**Zhao *et al.*, 2015**). As reported by Yang *et al.* (**2005**) ERF4 also localized in clastosome structures upon ethylene treatment.

Interestingly, clastosomes disappear when cells are treated with proteasome inhibitors such as MG132. In order to validate that the nuclear structures observed in MIF2 overexpressing cells are clastosomes, I incubated cells in a MG132 solution after transformation by *35S::MIF2-YFP* construct. Surprisingly, after MG132 treatment clastosomes disappeared but cytoplasmic aggregates (aggresomes) formed (**figure 78**). These kind of punctual cytoplasmic aggregates were describe for the first time in 1998 in animal cells as a location for the accumulation of misfolded proteins (**Johnston *et al.*, 1998**). In plants, these structures were discovered by Nakajima *et al.*, (2013), associated to the accumulation of non-degraded proteins following proteasome inhibition under stress conditions. Another study by Kamaguchi *et al.* (**2003**) showed that the aggresomes formation is regulated by the HDAC6 protein when the proteasome is inhibited. The aggresomes localized all along the microtubules.

The plasticity of clastosome shape upon hormonal treatment is an interesting phenomenon. Hence, in absence of a hormonal treatment, clastosomes appeared in the majority of cells overexpressing *MIF2* but they were bigger and fewer than under IAA or GA₃ treatments; clastosomes formed after GA₃ treatments were more numerous and smaller than under IAA treatments (**Figure 78**). Using airyscan confocal microscopy, I performed high resolution acquisition that showed the distribution of MIF2 in clastosomes inside the nucleus without any hormonal treatment, showing round-shaped structures of 1 µm of diameter partially aggregated and distributed in all the nucleus volume (**figure 79A**). However, co-localization experiments with YFP-NLS protein revealed an absence of colocalization of the

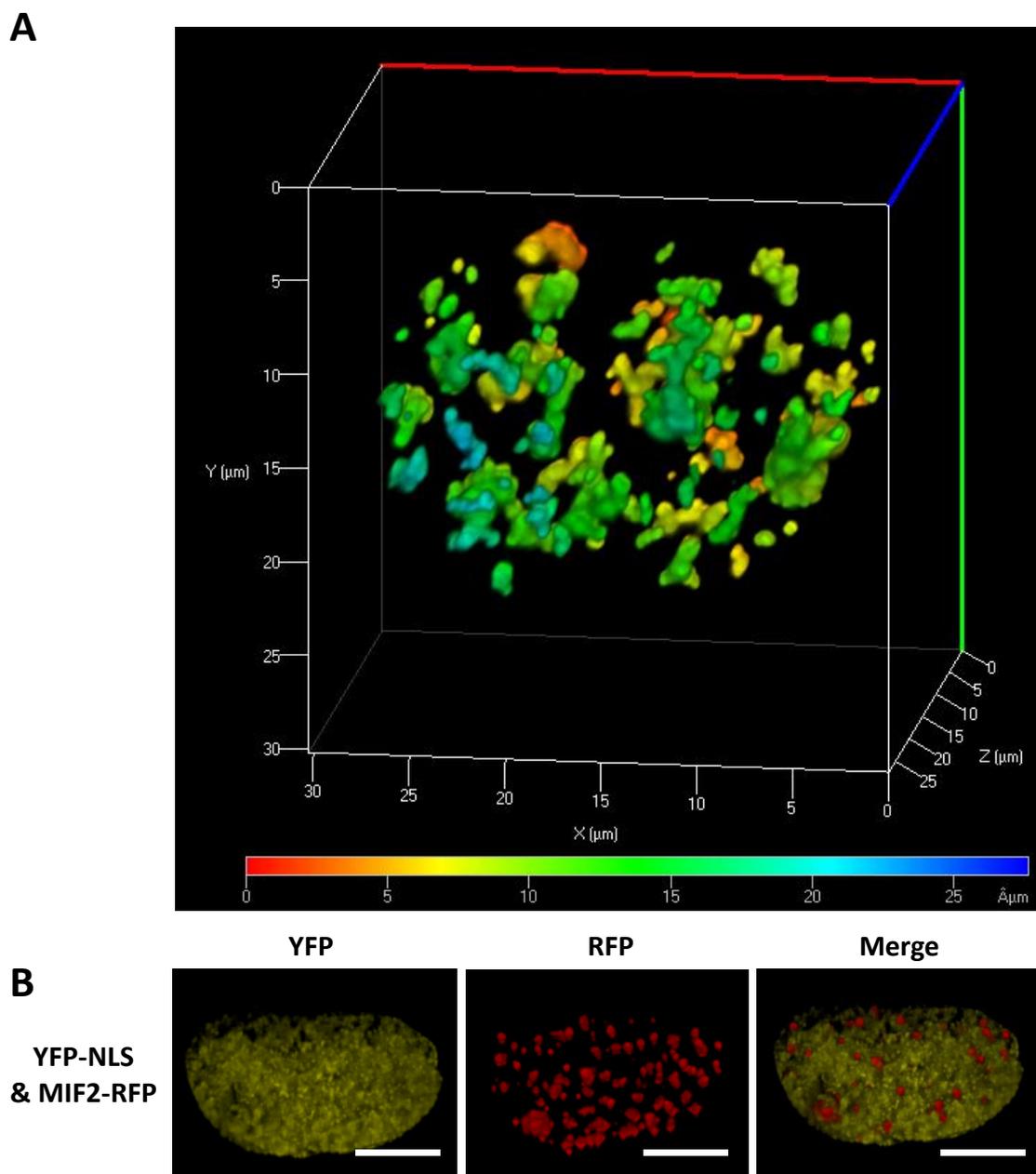


Figure 79: Subcellular localization of MIF2-RFPtag and YFP-NLS in onion epidermal cell. Image acquisition were made using confocal airy scan super-resolution technique.
(A) YFP and RFP stack images Z-projection of transformed onion epidermal cell nucleus.
Bar, 10 μ m
(B) Three-dimensional visualization of MIF2-RFPtag localization into nuclear bodies.
Color gradient represent depth.

two proteins (**figure 79B**). At the contrary MIF2 partners such as KNU colocalized perfectly in clastosomes when present suggesting that only MIF2 partners co-localize with it in clastosomes (data not shown) . However, it cannot be excluded that in the cells showing clastosomes without YFP signal, MIF2 was able to target other unlabeled endogenous proteins. The proteomic analyses of such structures after their isolation will be of a great interest to identify their protein composition when MIF2 is present in the cell.

Chapitre 3



Conclusions et perspectives

L'étude de l'implication des protéines Mini Zinc finger dans le développement floral et l'organogenèse chez *Arabidopsis* et la tomate présentée dans cette thèse met en lumière leur large rôle en tant que protéines adaptatrices. Cependant, une grande partie de leurs fonctions physiologiques et des mécanismes par lesquels ils agissent reste encore méconnues.

Bien que les gènes de la famille ZHD aient été découverts en premier chez la plante en C4 *Flaveria trinervia*, il est intéressant de noter qu'ils n'ont suscité un intérêt particulier qu'après leur découverte chez *A. thaliana* et la Tomate. De façon remarquable, leur identification chez ces espèces provient de la mise en place d'une approche identique. En effet, l'identification d'*IMA* est le résultat d'une étude qui débuta en 1996, visant à identifier les gènes préférentiellement exprimés durant les phases de développement précoce du fruit de tomate (**Sicard, 2008**). La découverte des ZHD chez *Arabidopsis* est, quant à elle, issue d'une étude visant à identifier les gènes préférentiellement exprimés au niveau floral (**Hu, 2003**). Ainsi, c'est avec le même objectif, celui d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans le développement reproductif et avec la même méthode, l'isolement de gènes spécifiquement exprimés dans ces tissus, que les auteurs de ces études ont soulevé la question de l'implication des gènes de la famille des MIF dans le développement reproducteur.

Jusqu'à récemment, bien que les recherches effectuées sur *MIF2* aient permis de suggérer son implication dans le développement floral, l'absence de perte-de-fonction a limité la compréhension de son rôle et des mécanismes sous-jacents (**Hu et Ma, 2006 et Hu, Feng et Ma, 2011**). Ce sont les travaux concernant *IMA*, son homologue chez la tomate qui ont marqué le début de l'élucidation de sa fonction dans le développement floral (**Sicard et al., 2008**).

***IMA* et *MIF2*, acteurs de la terminaison florale**

La mise en place d'un nombre bien défini d'organes floraux est un élément clé dans le succès reproductif d'une plante. Devant cet enjeu, les processus sous-jacents se doivent d'être robustes et fiables. Ainsi, l'arrêt de la prolifération des cellules souches au sein du méristème floral doit avoir lieu au moment opportun, en suivant la mise en place du gynécée, au cours d'une étape appelée terminaison florale. Cette étape cruciale met en jeu un réseau de régulation complexe dont la compréhension est encore très parcellaire. L'élément clé semble être la répression du gène à homéobox *WUS*, spécifiant l'identité des cellules souches. La

découverte de l'implication d'*IMA* chez la tomate dans la répression de *SIWUS* a été un premier pas dans l'élucidation de la fonction d'*IMA* dans la terminaison florale (**Sicard et al., 2008**). Chez *A. thaliana*, les travaux concernant la terminaison florale se sont particulièrement concentrés sur la voie principale impliquant *AG* et *WUS*, aboutissant à une description fine des mécanismes épigénétiques par lesquels *AG* réprime *WUS*. Dans un premier temps *AG* réprime *WUS* de manière directe via le recrutement de *CLF*. *CLF* est une protéine appartenant au complexe *PRC2* qui est responsable de l'hyperméthylation des histones ($H_3K_{27}me_3$) au niveau du 3'UTR du locus *WUS* laquelle aboutit à la répression transcriptionnelle de *WUS*. Dans un second temps, *AG* agit indirectement par le biais de l'activation de l'expression du facteur de transcription *KNU* qui va venir réprimer complètement l'expression de *WUS* par un mécanisme qui jusqu'à nos travaux était inconnu.

Les territoires d'expression d'*IMA* ou de *MIF2*, le contrôle de leur expression par *AG/TAG1* et la démonstration de leurs rôles respectifs dans la répression de *WUS/SIWUS* étaient autant d'éléments démontrant leur intervention dans le mécanisme de terminaison florale. Les protéines *IMA* ou *MIF2* ne présentant pas de capacité à interagir avec l'ADN mais pouvant s'associer à d'autres protéines, notamment celles qui possèdent un metallo-domaine, faisait de *KNU* le partenaire de choix dans leur intervention. La mise en évidence de leur capacité à interagir a conforté cette idée et a orienté les recherches vers la compréhension du mécanisme sous-jacent. L'isolement de *SIKNU*, l'homologue de *KNU* chez la tomate et la démonstration de son intervention dans la régulation de l'expression de *SIWUS* confirmant la possibilité d'un mécanisme identique chez les deux espèces, une implication similaire des protéines *IMA* et *MIF2* était dès lors vraisemblable. L'unique information concernant le mécanisme d'action potentiel de *KNU* provient de la présence dans sa séquence d'un domaine de répression de type *EAR*. Ce domaine est notamment impliqué dans des interactions avec les co-répresseurs de la famille de *TPL*. La possibilité qu'un complexe impliquant *KNU*, *TPL* et *MIF2* se forme a été étudiée et a permis de montrer le rôle clé des protéines *IMA* ou *MIF2* dans la formation de ce complexe. L'isolement au sein du locus *WUS* d'une séquence de fixation commune à ces protéines a permis de confirmer leur implication dans la régulation de *WUS*. L'interaction de *TPL* avec l'histone déacétylase *HDA19* ainsi que la sensibilité de l'expression de *WUS* à la perturbation de l'activité des *HDA* ont ensuite abouti à l'hypothèse

de l'intervention d'un nouveau mode de régulation de l'expression de *WUS* lors de la terminaison du méristème floral qui implique l'acétylation des histones (**Bollier et al., soumis**). La confirmation de ce modèle chez la tomate nécessite aujourd'hui de déterminer si les sites de fixation sur le locus de *SIWUS* sont conservés. Pour cela, des plantes surexprimant la protéine IMA fusionnée à la YFP sont d'ores et déjà disponibles et vont permettre d'effectuer des expériences de ChIP à partir de bourgeons floraux. De plus, des plantes surexprimant les protéines IMA fusionnée au tag HA, SIKNU fusionnée au tag MYC et SIHDA19 fusionnée à la GFP simultanément ont été produites afin d'effectuer des expériences de co-immunoprécipitation permettant de démontrer l'existence du complexe et d'évaluer la présence des trois protéines sur les mêmes sites de fixation par ChIP-qPCR. Des expériences de ChIP-seq sont également prévues afin de mettre en évidence l'ensemble des cibles communes à ces protéines. En parallèle, l'évaluation du niveau d'acétylation des histones au locus *WUS* devra être réalisée. Pour cela des expériences de ChIP-qPCR seront effectuées en utilisant des anticorps ciblant les histones modifiées (H_3K_9ac en particulier) sur des préparations de chromatine issues de bourgeons floraux avant et après l'étape de terminaison florale, isolés à partir de plantes sauvages ou surexprimant les différentes protéines précédemment citées.

Un autre élément de la régulation de *WUS* démontré chez *Arabidopsis* et correspondant à sa répression directe par AG devra être étudié chez la tomate. En effet, comme mentionné précédemment, la répression de *WUS* débute avec le recrutement de CLF au niveau de la portion 3'UTR du locus *WUS* par AG entraînant une hyperméthylation de type $H_3K_{27}me_3$ (**Liu et al., 2011**). Chez la tomate, nous avons vu dans l'introduction que la présence de deux SNP dans le locus *lc*, situé au niveau de la portion 3'UTR du gène *SIWUS*, étaient responsables d'une variation du nombre de loges dans les fruits de tomate. Ces SNP semblent situés dans une séquence ressemblant fortement à une CarG box, séquence de fixation privilégiée des protéines de la famille d'AG (**Van der Knaap et al., 2014**). Il serait intéressant d'envisager des expériences de retard sur gel en utilisant la protéine TAG1 et les séquences présentant les SNP au niveau du locus *lc* ainsi que des expériences de ChIP-qPCR contre la protéine TAG1 durant la terminaison florale afin d'évaluer la capacité de fixation de TAG1 sur cette séquence. En effet, ces expériences permettraient de valider la conservation du réseau génétique de la terminaison du méristème floral entre *A. thaliana* et la tomate et permettrait d'ouvrir des voies quant au contrôle du nombre de loges par le biais de modifications de l'expression des

éléments du réseau de régulation.

Bien que le réseau de régulation génétique impliquant *AG*, *KNU* et *MIF2* semble conservé avec leurs homologues *TAG1*, *SIKNU* et *IMA* chez la Tomate, la différence d'effets de la perte de fonction d'*IMA* chez la tomate ou de *MIF2* chez *A. thaliana* obtenue grâce aux approches RNAi a soulevé la question de l'équivalence fonctionnelle des deux protéines. Au vu des résultats obtenus à ce jour, il semble que les deux protéines jouent un rôle équivalent dans la régulation de *WUS* et les différences de résultats obtenus peuvent s'expliquer de nombreuses manières. La première est liée à la redondance fonctionnelle qu'exercent les différents gènes MIF. En effet, bien que chez *A. thaliana* seul *MIF2* soit exprimé au cours du développement floral chez les plantes sauvages, leur expression semble induite dans les bourgeons floraux des plantes perte de fonction pour *MIF2* que nous avons obtenues, suggérant une adaptation de la plante concernant leur expression pour compenser l'absence de *MIF2*, et assurant son bon développement grâce à la redondance fonctionnelle des trois protéines.

Un autre élément correspond à la différence de sensibilité des deux plantes à la perturbation de l'expression de *WUS* en réponse à une perturbation de l'expression de *CLV3* (cf introduction). En effet, alors qu'*A. thaliana* ne présente aucun phénotype quand l'expression de *CLV3* est fortement réduite, la Tomate présente un phénotype fascié important dans les mêmes conditions. De manière analogue, la réduction d'expression concernant *IMA* a donné lieu à des phénotypes importants dans le développement floral et du fruit tandis qu'une réduction assez forte du niveau d'expression de *MIF2* n'a donné lieu à aucun phénotype visible. Les données dont nous disposons aujourd'hui indiquent que les phénotypes observés sont liés à la perturbation de l'expression de *WUS*. Ce résultat peut s'expliquer par cette différence de sensibilité des deux plantes à l'altération de l'expression de *WUS*. Ainsi, bien que les voies que nous mettons en évidence semblent conservées entre les deux espèces, il est important de rappeler que de nombreuses autres voies sont impliquées dans le mécanisme de terminaison du méristème floral. Elles peuvent être différentes et ne pas avoir été élucidées chez la tomate et peuvent expliquer les différences observées. Bien que certains interactants des protéines *MIF2* ou de *IMA* soient conservés, il est possible que d'autres interactants non encore identifiés soient impliqués et soient différents entre

A. thaliana et la Tomate. Ainsi, il serait intéressant de voir si les protéines IMA ou MIF2 interviennent par le biais d'autres intervenants. Parmi les partenaires de choix, la protéine SUP est intéressante car elle partage un territoire d'expression commun avec les gènes *IMA* et *MIF2* et intervient par une voie parallèle à celle d'AG. Il nous a été possible de montrer par BiFC que MIF2 est capable d'interagir avec SUP, ouvrant la possibilité d'une implication dans un mécanisme de régulation commun. Le mécanisme d'action de SUP dans la terminaison florale reste mystérieux mais son homologie avec la protéine KNU suggère un mécanisme similaire. Ainsi, il est possible que, tout comme dans le cas de KNU, MIF2 puisse intervenir en tant que protéine adaptatrice pour d'autres protéines à doigt de zinc tel que SUP. Cette interaction pourrait également permettre la formation d'un complexe protéique intervenant dans le mécanisme de terminaison du méristème floral. De plus, et bien qu'à ce jour aucune information ne soit disponible à ce sujet, il est tout à fait possible d'imaginer une intervention des protéines IMA ou MIF2 dans la terminaison du méristème floral au travers des protéines ZHD. En effet, certaines ZHD ont une expression florale et interviennent dans la régulation de la division et de l'expansion cellulaire. Ainsi, l'élucidation de la fonction d'*IMA* ou de *MIF2* dans le mécanisme de terminaison du méristème floral n'en est sans doute qu'à ces balbutiements, et l'étude de sa fonction au travers des différents partenaires identifiés est complexe.

Les autres MIF chez la tomate

Un autre élément à prendre en compte dans la complexité de la régulation du développement floral est la mise en évidence de plusieurs gènes (dont *SIMIF6* et *SIMIF7*) dont les séquences sont proches d'*IMA* et qui sont exprimés au cours du développement de la fleur et du fruit. La fonction de ces gènes est encore inconnue mais leur expression suggère une intervention dans le développement de la fleur et du fruit. De plus, la capacité de *SIMIF7* à interagir avec le partenaire d'*IMA*, *SIKNU*, pourrait donner lieu à une redondance fonctionnelle ou au contraire, à une compétition. Dans le cas des plantes *IMA* perte-de-fonction étudiées (RNAi), la proximité de la séquence de ces gènes avec celle du gène *IMA* a pu conduire à une réduction de leur expression. Ainsi, le cumul de la diminution du niveau d'expression d'*IMA* et de ces gènes a pu engendrer des phénotypes plus marqués. De la même manière, il nous a été possible de montrer que ces protéines sont capables d'interagir avec *IMA*, mais aussi avec la protéine chimérique *IMA^{ch}*. Ainsi, la surexpression de la protéine *IMA^{ch}*

pourrait donner lieu à la formation d'hétérodimères non fonctionnels et donc à une perte de fonction pour ces gènes, ce qui pourrait expliquer les phénotypes encore plus importants chez ces plantes. Ainsi, l'analyse du niveau d'expression de ces gènes dans les plantes *IMA* perte-de-fonction devra être effectuée et comparée aux plantes sauvages afin de vérifier leur implication. Bien que la mutagenèse dirigée par CRISPR/Cas9 n'ait pas permis d'aboutir à l'obtention de mutant KO pour *IMA*, la perte de fonction partielle engendrée par la mutation de la boîte de fixation de TAG1 dans son promoteur donne des résultats encourageants, confirmant que les phénotypes observés proviennent de la perte de fonction du gène *IMA*. Une analyse devra être effectuée sur ces plantes afin d'évaluer, par comparaison avec les autres plantes perte-de-fonction, si l'ensemble des phénotypes sont imputables à la perte de fonction du gène *IMA*. Il serait bien évidemment particulièrement intéressant de déterminer s'il est possible d'obtenir des plantes perte de fonction pour les autres gènes. Ainsi, il serait possible de réaliser l'analyse fonctionnelle de ces gènes afin d'évaluer leurs rôles dans le développement floral et du fruit et la redondance de leurs fonctions avec celle du gène *IMA*. La mutagenèse dirigée par CRISPR/Cas9 sera donc un outil de choix pour l'obtention de plantes mutées pour ces gènes. Il est intéressant de noter que la présence d'un seul gène MIF exprimé au niveau floral est une particularité d'*A. thaliana* au vu de nos connaissances actuelles. En effet, l'étude effectuée sur *Brassica rapa* révèle la présence de 7 MIF dont 6 sont fortement exprimés au niveau floral. Plusieurs hypothèses sont possibles pour expliquer cette différence entre ces deux espèces proches : (i) la diversité des gènes *MIF* est peut-être associée à une redondance fonctionnelle chez ces espèces, (ii) *MIF2* chez *A. thaliana* est peut-être impliqué dans plusieurs processus tandis que ses fonctions sont assurées par plusieurs gènes *MIF* dans les autres espèces, (iii) ces gènes jouent de nouvelles fonctions dans ces espèces. Ces hypothèses ne sont bien évidemment pas exclusives. L'absence de mutant KO chez *A. thaliana* suggère que la fonction du gène *MIF2* est nécessaire à la vie de la plante. La redondance fonctionnelle jouée par les autres gènes chez les autres espèces pourrait être un avantage en palliant le problème de létalité dû à l'apparition d'une seule mutation.

Un autre élément intéressant concerne les importantes différences de niveau d'expression concernant les différents gènes MIF chez la Tomate et *A. thaliana*. En effet, alors que chez la Tomate, *IMA* fait partie des gènes les plus exprimés au cours du développement du fruit, le

niveau d'expression de ses homologues est très bas et le niveau d'expression de *MIF2* dans la silique d'*A. thaliana* est relativement faible. Quelle peut être la raison d'un tel niveau d'expression chez la Tomate ? Le pic d'expression d'*IMA* se situant à la transition des phases de division cellulaire et d'expansion cellulaire du développement du fruit de tomate, le niveau d'expression du gène *IMA* peut être lié à cette étape particulière de développement du fruit charnu qui n'existe pas chez *A. thaliana*. En effet, *IMA* ayant une action inhibitrice sur la prolifération cellulaire, il est possible qu'une grande quantité d'*IMA* soit particulièrement requise à ces stades pour réguler le cycle cellulaire et ainsi le contrôle du nombre de cellules.

En conclusion, il est possible que l'homologie fonctionnelle mise en évidence entre *IMA* et *MIF2* au cours de la terminaison florale soit une particularité et que la fonction jouée par ces gènes dans d'autres mécanismes comme le développement du fruit soit très différente chez ces deux espèces. Les résultats obtenus quant à la fonction de *MIF2* dans d'autres mécanismes tels que le contrôle de la taille des graines et la régulation des gènes de la fonction B sont autant de phénotypes particulier à la surexpression et à la perte de fonction de *MIF2* chez *A. thaliana* suggérant une participation de ces gènes à des mécanismes communs et différents.

Rôle de *MIF2* dans le contrôle de la taille des graines : implication dans la voie des GA ?

Les travaux initialement effectués sur les gènes *IMA* chez la tomate et *MIF2* chez *A thaliana* ont permis de mettre en évidence leur rôle dans la régulation hormonale et en particulier, les voies des auxines et des GA (**Sicard et al. 2008 et Hu et al. 2011**). Par la suite, la découverte de la capacité d'interaction entre *MIF2* et la sous unité CSN5 du signalosome et la similarité des phénotypes entre les plantes *MIF2* surexpresses et le mutant *csn5a1* avait conduit J. Leblond à étudier l'implication de cette interaction dans la fonction de *MIF2*. Ses travaux ont permis de démontrer que *MIF2* participe à la régulation de la réponse à l'auxine par son interaction avec la protéine CSN5. En effet, cette interaction entraîne l'inhibition de l'activité de CSN5 et son exclusion du noyau limitant ainsi la dégradation des Aux/IAA nécessaire à la réponse à l'auxine (**Leblond, 2008**). Par cette même activité, *MIF2* pourrait aussi intervenir dans la réponse aux GA. En effet, l'inhibition de CSN5 devrait empêcher la dégradation des

DELLA réprimant la réponse aux GA. Cependant, ce n'est pas le cas (Leblond 2008). En effet, l'intervention de MIF2 dans la réponse aux GA semble passer par l'intervention d'autres partenaires, et parmi les partenaires de choix dans ce mécanisme, nous retrouvons les protéines ZHD.

Comme indiqué précédemment dans l'introduction, les récents travaux effectués sur les gènes ZHD révèlent leur intervention dans la régulation des GA, impactant notamment le développement de la graine (**Bueso et al., 2014**). Nos travaux ont permis de confirmer que la perturbation de plusieurs ZHD engendrait une perturbation du développement de la graine et de montrer que la protéine MIF2 intervenait elle aussi dans cette voie et ce, très certainement par sa capacité d'interaction avec les ZHD. En effet, par des expériences de BiFC, il nous a été possible de confirmer un certain nombre d'interactions entre MIF2 et plusieurs ZHD soutenant les résultats précédemment obtenus par double hybride chez la levure (**Tan et Irish, 2006**). L'augmentation de la taille des graines et du mucilage dans les lignées *MIF2* gain- et perte de fonction suggère que le mécanisme est complexe et ne fait pas intervenir qu'une seule voie. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées à ce sujet. L'effet des protéines MIFs originellement décrites comme des peptides interférant en raison de leur capacité à inhiber l'activité des ZHD en formant des hétérodimères inactifs peut être évoqué. Ainsi la perte de fonction pour *MIF2* serait à l'origine de la libération d'un certain nombre de ZHD, perturbant la régulation des GA et engendrant un phénotype au niveau des graines similaire à celui observé chez les plantes surexprimant *ZHD1* décrit par **Bueso et al. (2014)**. La surexpression de *MIF2* quant à elle, est à l'origine d'un grand nombre d'altérations en lien avec la capacité de la protéine MIF2 à interagir avec un grand nombre de partenaires, et donne lieu à des perturbations de l'expression de nombreux gènes dont les ZHD. Par ailleurs, ces perturbations entraînent la formation de siliques de plus petite taille contenant moins de graines, suggérant qu'une charge plus importante dans les graines peut avoir lieu donnant un phénotype similaire à celui observé dans les pertes de fonction. De plus, le niveau d'expression des gènes *RGL1/2/3* codant les protéines DELLA est réduit dans les plantes surexprimant *MIF2* (**Leblond, 2008**), ce qui peut entraîner une augmentation de la taille des graines comme le montrent les quintuples mutants pour les *della* (**Bueso et al., 2014**).

Ainsi, la compréhension de l'implication de MIF2 dans la voie des GA est difficile, la surexpression ne renseignant pas sur la fonction physiologique de MIF2 et la perte de fonction étant, en l'état actuel des connaissances, restreinte au développement floral précoce. Cependant, l'observation d'une augmentation de la taille des graines dans les lignées *MIF2* perte-de-fonction indique que son expression au cours du développement précoce de la fleur et du fruit impacte la taille des graines. Il serait intéressant d'étudier le développement de la graine et de l'embryon dans ces lignées afin de déterminer si, comme dans le cas du mutant *ap2*, l'augmentation de la taille de la graine est liée à un maintien de la prolifération des cellules de l'albumen et de l'embryon (Ohto *et al.*, 2005 et Ohto *et al.*, 2009).

Un autre élément important correspond à la coloration moins prononcée des graines des plantes *MIF2* gain et perte-de-fonction. La coloration brune des graines d'*A. thaliana* est liée à la présence d'épicatéchine (Lepiniec *et al.*, 2006). L'un des gènes impliqué dans la régulation de la synthèse d'épicatéchine dans la graine est le gène à MADS-Box participant à la fonction D, *SEEDSTICK* (Mizzotti *et al.*, 2014). En effet, le mutant *stk* présente des graines de plus petite taille accumulant plus d'épicatéchine. Les travaux effectués sur *IMA* chez la tomate ont permis de montrer qu'il intervenait dans la répression des gènes de la fonction D. Les études d'expression réalisées chez *A. thaliana* suggèrent que le gène *STK* voit son expression augmentée dans les plantes perte-de-fonction pour *MIF2* confirmant le rôle de MIF2 en tant que répresseur de la fonction D. Ce rôle tend à être confirmé par les phénotypes observés, les graines de plus grande taille et moins colorées seraient plutôt associées à une augmentation de l'activité de *STK*. Une information complémentaire intéressante correspond à l'augmentation de l'expression du gène *CSN5A* dans les inflorescences et les bourgeons floraux du mutant *stk* révélé par RNAseq (Mizzotti *et al.*, 2014). Ainsi, la perte de fonction pour *MIF2* aurait un double effet, en libérant la sous-unité CSN5 qui intervient dans la levée d'inhibition de nombreuses voies de signalisation qui régulent notamment la prolifération cellulaire et en augmentant le niveau d'expression de *STK*. A cela s'ajoute l'absence d'inhibition des ZHD engendrant une augmentation de la quantité de GA aboutissant au phénotype observé. Ainsi, l'ensemble des informations disponibles semble démontrer l'intervention de *MIF2* dans la régulation de la taille des graines par le biais de la régulation des gènes impliqués dans leur développement, notamment aux travers de la régulation des

GA. Il est intéressant de noter que l'analyse RNAseq précédemment citée, effectuée sur des inflorescences et des siliques en développement du mutant *stk* a aussi permis de mettre en évidence une élévation du niveau d'expression de *MIF1* d'un facteur 4 à 5, reliant de nouveau les gènes *MIF* et ceux de la fonction D mais le mécanisme dans lequel intervient la protéine STK pour réguler les gènes *MIF* reste à étudier. En premier lieu, l'étude de la taille des graines chez des plantes surexprimant le gène *STK* devra donc être effectuée pour valider sa fonction dans ce mécanisme puis le niveau d'expression des gènes *MIF* devra être analysé pour confirmer l'implication de *STK* dans la régulation de leur expression.

MIF2, un intervenant dans la régulation des gènes de la fonction B ?

Les résultats des analyses de l'expression de *MIF2* dans les primordia de pétales et dans les étamines, des phénotypes observés chez les plantes gain- et perte-de-fonction et de l'altération du pollen dans les lignées dérégulées pour *IMA*, suggèrent l'intervention de *MIF2* dans le développement de ces organes floraux et potentiellement dans la régulation de l'expression des gènes de la fonction B. L'analyse de l'expression d'*AP3* et *PI* a permis de montrer que les altérations homéotiques étaient bien liées à la diminution de leurs expressions. De plus, la similarité des phénotypes observés chez les mutants *csn5*, *csn6* et *csn1* nous conduit à émettre l'hypothèse que la perturbation observée est liée à l'absence de dégradation du répresseur d'*AP3* en lien avec une perturbation de l'activité du complexe SCF^{UFO} (Serino *et al.*, 2003 et Wang *et al.*, 2003). L'hypothèse la plus probable concernant ce phénotype chez les plantes *MIF2* gain-de-fonction concerne l'effet inhibiteur joué par *MIF2* sur la sous-unité CSN5 engendrant l'absence de dégradation du répresseur. Mais à l'image du phénotype concernant la taille des graines, les plantes *MIF2* perte de fonction présentent un phénotype similaire suggérant que la protéine *MIF2* jouerait un rôle dans le bon développement des pétales et des étamines ce qui serait cohérent avec ses territoires d'expression. Dans ce cas, comment *MIF2* intervient-il pour réguler l'expression des gènes *AP3* et *PI* ?

L'expression des gènes de la fonction B est régulée par de nombreux gènes dont *LFY*, *AP1*, *UFO* mais aussi *AG* et *AP3/PI* eux-mêmes. Il est intéressant de noter que l'expression des gènes

AP3 et *PI* tout comme celle d'*AG* est sous la dépendance des GA (Yu *et al.*, 2004). En effet, l'ajout de GA engendre une augmentation du niveau d'expression d'*AP3*, *PI* et *AG* en lien avec la dégradation des DELLA. Ainsi, la perturbation de la voie des GA dans les plantes *MIF2* gain- et perte-de-fonction pourrait être une des causes de la perturbation de l'expression des gènes *AP3* et *PI*. Cependant, alors que les graines sont plus grosses, suggérant une activation plus importante de la voie des GA, les fleurs présentent des phénotypes perte de fonction pour *AP3* et *PI* suggérant une réduction de la quantité de GA. Il serait intéressant de traiter les fleurs avec des GA exogènes de façon à déterminer si elles permettent une restauration du phénotype et d'analyser le contenu en GA afin d'évaluer si les plantes présentent un défaut de synthèse des GA.

Une autre hypothèse permettant d'expliquer l'implication de *MIF2* dans la régulation des gènes de la fonction B correspond à son rôle en tant que protéine adaptatrice. En effet, Krogan *et al.* (2012) ont mis en évidence l'existence d'un complexe multimérique composé d'*AP2*, de *TPL* et d'*HDA19* intervenant dans la régulation des gènes de la fonction B, C et E. Il est intéressant de noter que chez le quintuple mutants *tpl/tpr1/2/3/4* et chez le mutant *hda19*, le développement floral est altéré, formant des fleurs composées d'organes carpelloïdes à la place des pétales et des étamines, et cela associé à une augmentation de l'expression des gènes de la fonction B et C. Ce phénotype, très similaire à celui obtenu chez les plantes dérégulées pour l'expression de *MIF2* est aussi obtenu chez les plantes mutantes *svp sap18*, en lien avec l'intervention de *SAP18* dans la régulation de *SEP3*, gène essentiel dans le contrôle de l'expression des gènes de la fonction B. Enfin, des phénotypes similaires sont aussi retrouvés chez les plantes perturbées dans l'expression du gène *SUP* intervenant lui aussi dans la régulation des gènes de la fonction B.

Ainsi, l'intervention de *MIF2* dans la régulation des gènes de la fonction B peut être liée à l'ensemble de ces différentes voies et ne fait certainement pas intervenir une voie unique. Toutes ces informations amènent à de nombreuses questions : la protéine *MIF2* participe-t-elle à la formation d'autres complexes tout comme il le fait pour *KNU-TPL-HDA19* ? Se pose alors également la question d'un rôle plus général en tant que protéine adaptatrice permettant de faciliter la formation de ce type de complexe. Une autre hypothèse peut être qu'au contraire, la protéine *MIF2* perturbe la formation de ce complexe par la réalisation

d'autres complexes impliquant TPL et HDA19. Les réponses à ces questions nécessitent la réalisation de nombreux travaux ; l'isolement de l'ensemble des partenaires de MIF2 au sein des tissus où il est naturellement exprimé serait une source d'information importante. Pour cela des expériences d'immunoprécipitation devront être réalisées. La présence de forte similarité de séquences entre les différents MIF mais aussi les ZHD pourrait rendre difficile l'obtention d'anticorps spécifiques ; il semble donc plus approprié à première vue d'utiliser des plantes exprimant la protéine MIF2 taguée sous son promoteur natif, mais cela requiert aussi un travail assez lourd et des limitations techniques. En effet, afin d'éviter une compétition entre la protéine native et la protéine taguée, il serait nécessaire de l'exprimer dans des plantes KO pour le gène endogène. Or, la perte de fonction pour *MIF2* semble être létale. Il est malgré tout envisageable de générer des mutations par la technologie CRISPR-Cas9 au sein de plantes transgéniques exprimant une cassette codant la protéine MIF2 taguée de séquence modifiée qui ne serait ainsi pas sujette à la mutagenèse. Ces lignées pourront ainsi être utilisées pour les expériences d'immunoprécipitations visant à isoler les partenaires de MIF. Son territoire d'expression étant très restreint et son niveau assez faible, cela sera aussi une contrainte technique d'importance. Par ailleurs cette lignée pourra aussi servir à des expériences de ChiP-seq visant à isoler les locus ciblés par les complexes au sein desquels MIF2 est retrouvée.

Pour conclure, la perturbation de l'expression des gènes *IMA* ou *MIF2* entraîne de très nombreuses altérations du développement floral rendant particulièrement complexe l'élucidation des mécanismes au sein desquels la protéine IMA ou MIF2 est impliquée. A nouveau, l'absence de plantes *IMA* ou *MIF2* perte de fonction limite les analyses et rend difficile l'obtention de conclusions claires. Nous l'avons vu, la spécificité de fonction des protéines MIF est liée à leurs territoires d'expression, mais nous avons aussi pu mettre en évidence que leur spécificité d'interaction semble être un élément essentiel de leur fonction.

Les protéines MIF : la régulation par interactions

La diversité des interactants des protéines MIF suggère qu'elles possèdent une structure particulière et flexible. Cependant, malgré cette diversité, elles font preuve de spécificité comme cela a pu être démontré avec les membres de la famille ZHD (**Hong et al., 2011**). Il est

à noter que la structure tridimensionnelle des protéines MIF est toujours inconnue et son élucidation pourrait apporter des informations essentielles à notre compréhension du mécanisme d'interaction. Le dichroïsme circulaire en UV lointain pourra être utilisé sur de la protéine produite en bactérie d'ores et déjà disponible afin d'avoir un aperçu des structures secondaires présentes ainsi que du désordre intrinsèque de la protéine. Bien qu'elle soit techniquement lourde, il pourrait aussi être envisagé d'effectuer la cristallisation de cette protéine. La cristallisation des protéines désordonnées étant parfois impossible, il serait plus pertinent de la cristalliser sous forme de complexe, ce qui permettrait de surcroît d'accéder à des informations concernant la formation de l'interaction avec ses partenaires. Par nos travaux, nous avons pu montrer que les protéines MIF présentent un niveau de désordre intrinsèque très élevé dans leurs partie N- et C-terminale associé à la présence d'acides aminés phosphorylables. Par la création de variants phosphoablatifs ou phosphomimétiques, nous avons pu montrer que la phosphorylation dans la région N-terminale prédite comme désordonnée était essentielle à leur localisation nucléaire et que cela influé sur leur capacité d'interaction avec certains partenaires. Ces données suggèrent qu'un niveau supplémentaire quant à la régulation des protéines MIF existe par le biais de leur statut de phosphorylation. Ces informations apportent un niveau de complexité supplémentaire quant à notre compréhension de l'activité physiologique des protéines MIF. Pour ce faire, l'effet phénotypique de la surexpression de ces variants phosphoablatifs ou phosphomimétiques *in planta* devra être évalué afin de déterminer si la phosphorylation est un élément clé dans la capacité des MIF à réguler les nombreuses voies physiologiques que nous avons abordées. A ce jour, aucune protéine kinase n'a encore été identifiée comme étant capable d'interagir avec les protéines MIF ; ainsi, l'enzyme responsable de leur phosphorylation reste à identifier. Il est intéressant de noter qu'une interaction physique a pu être mise en évidence par double hybride entre ZHD10 et la protéine kinase sucrose non-fermenting (SNF1)-related protein kinase 1 (SnRK1) (**Nietzsche et al., 2015**) ; il serait intéressant d'évaluer de manière ciblée son interaction avec les protéines MIF en tant que candidat potentiel à leur phosphorylation. Par ailleurs, l'évaluation du statut de phosphorylation des protéines IMA et MIF2 au cours du développement floral pourrait être une voie à explorer afin de mieux évaluer son implication dans ce processus en lien avec les partenaires que nous avons découvert. Ainsi, il serait d'ores et déjà possible d'effectuer des immunoprécipitations contre les protéines IMA et MIF2

taguées à partir d'extraits protéiques issus de bourgeons floraux et d'analyser leur état de phosphorylation par spectrométrie de masse.

Quel sens peut-on donner à la localisation subcellulaire de la protéine MIF2 ?

La présence de la protéine MIF2 au sein des structures appelées clastosomes soulève un grand nombre de questions. En effet, pour quelle raison ces structures apparaissent-elles lors de la surexpression de MIF2 ? Les observations effectuées sur les lignées rapportrices *pMIF2::MIF2-YFP* présentent aussi dans une certaine proportion de cellules la présence de ces clastosomes. Ces structures semblent donc constituer une localisation physiologique de la protéine MIF2. Leur caractérisation plus précise à l'aide de la microscopie électronique à transmission pourrait nous fournir des informations intéressantes sur ces structures au sein des cellules végétales. Nous savons que ces structures sont liées à une activité protéolytique importante impliquant le protéasome 26S. En quoi leur apparition et leur forme sont-elles influencées par les hormones ? La localisation de MIF2 mais aussi de ses partenaires dans le contexte d'une surexpression de MIF2 suggère donc une perturbation de l'activité protéolytique de la cellule. Il est possible que MIF2 soit capable d'interagir avec une ou plusieurs sous-unités du protéasome, d'autant plus que certaines d'entre elles possèdent une structure proche de la sous-unité CSN5 avec laquelle MIF2 interagit. Il faudrait donc tester la capacité d'interaction de MIF2 avec les différentes sous-unités du protéasome. Ainsi, la perturbation de l'activité protéolytique par MIF2 engendrerait la formation des clastosomes de manière directe. Cependant, cela n'explique pas pourquoi certains partenaires de MIF2 sont eux aussi retrouvés dans ces clastosomes : y sont-ils dégradés ? L'analyse de la durée de vie de CSN5 n'avait pas permis de conclure à un raccourcissement de sa demi-vie en présence de MIF2 (**Leblond, 2011**) ; en est-t-il autrement pour les autres partenaires ? MIF2 pourrait aussi engendrer l'apparition des clastosomes de manière indirecte. En effet, nous savons que la surexpression de MIF2 va entraîner l'inhibition de la sous-unité CSN5. Cette inhibition peut être à l'origine d'une accumulation de protéines orientées vers la voie de dégradation par le protéasome.

Conclusion : IMA et MIF2, des gènes d'intérêt agronomique aux multiples facettes

La perturbation de l'expression des gènes *IMA* et *MIF2* donne lieu à de nombreux phénotypes en lien avec les altérations physiologiques occasionnées. Ces altérations sont autant de possibilités dont il serait possible de tirer parti dans des objectifs d'amélioration végétale. En effet nous avons vu dans la première partie l'importance d'*IMA/MIF2* dans le contrôle du nombre de loges, qui est un caractère d'intérêt pour l'amélioration du fruit de Tomate.

Chez *A. thaliana*, le rôle de *MIF2* dans le contrôle de la taille des graines en fait un gène d'importance en utilisant le transfert des connaissances acquises dans des espèces proches pour lesquelles le rendement en graines est important tels que le colza. Ainsi, il serait intéressant d'évaluer si l'augmentation de la taille des graines couplée à l'augmentation du nombre de valves donne lieu à une augmentation de rendement. Par la suite, le lien entre la taille des graines et la séquence ou l'expression des gènes MIF identifiés chez le colza sera une voie à explorer afin d'isoler des variants au rendement augmenté. Dans ce sens, on peut noter que des travaux sont en cours avec pour objectif d'évaluer l'effet de la surexpression d'*IMA* sur la productivité du *Jatropha curcas* dont l'huile contenue dans les graines est utilisée pour faire des biocarburants (**Paserang et al., 2015**).

Par ailleurs, bien que cela n'ait pas été évoqué au cours de cette thèse, les travaux précédents concernant l'action de *MIF2* sur la sous-unité du signalosome CSN5 ont abouti à la publication d'un brevet concernant la résistance aux virus du groupe des *Potyviriidae*. En effet, l'inhibition du signalosome par *MIF2* limite son détournement par les virus et rend les plantes résistantes. Des travaux sont effectués à ce jour dans l'objectif d'évaluer comment cette résistance peut être dissociée des effets pléiotropes liés à la surexpression de *MIF2* afin d'obtenir des plantes résistantes ayant un phénotype proche des plantes sauvages. Le travail ici effectué concernant la structure, les domaines d'interactions et le rôle de la phosphorylation dans la spécificité d'interaction sont autant d'éléments exploitables pour isoler des variants de MIF permettant une meilleure résistance au virus en limitant les effets délétères de sa surexpression.

L'ensemble de ces caractères sont d'une importance cruciale pour répondre aux besoins de l'agriculture de demain. L'acquisition de nouvelles connaissances concernant le développement reproducteur des plantes est une étape nécessaire à l'augmentation de la productivité et de la qualité des produits de l'agriculture, conditions *sine qua non* à l'alimentation d'une population grandissante. Les travaux effectués dans le cadre de cette thèse se sont inscrits dans cette problématique agronomique et apportent des éléments nouveaux qui viennent enrichir les connaissances existantes afin d'y apporter des solutions.

Chapitre 4



Matériel et Méthodes

Matériel biologique

Matériel végétal et conditions de culture

Solanum lycopersicum

Les plants de tomate *Solanum lycopersicum* Mill. cv. West Virginia 106 (WVA106) sont cultivés soit en serre, soit *in vitro* en conditions axéniques dans du milieu Murashige and Skoog (MS) (**Murashige and Skoog, 1962**) et dans les conditions de photopériode de 16h de jour/8h de nuit et de thermopériode de 25°C le jour/20°C la nuit. Les graines de tomate, préalablement décontaminées par un traitement de 15min à l'hypochlorite de sodium 4,5% (v/v) et 0,05% (v/v) de Tween 20 puis rincées trois fois à l'eau mQ stérile sont semées sur du milieu MS dilué au ¼ ou séchées sous hotte à flux laminaire puis conservées déshydratées dans des boîtes de Petri scellées.

Arabidopsis thaliana

Les écotypes Columbia (Col-0), Landsberg *erecta* (*Ler*) ainsi que le croisement Col-0**Ler* d'*Arabidopsis thaliana* ont été utilisés comme lignées de référence. Le mutant *ag-3* (Sablowski R.) a pour écotype *Ler*. Les lignées *pWUS::GUS* ont pour écotype le croisement Col-0**Ler* (Laufs P.). Les graines sont décontaminées pendant 15min dans une solution contenant 4,5% (v/v) d'hypochlorite de sodium et 0,02% (v/v) de Triton X100, rincées 5 fois dans de l'eau mQ stérile puis semées en conditions d'asepsie sur boîte de Petri contenant du milieu MS dilué au ½. Après stratification à 4°C pendant 2 jours à l'obscurité les boîtes sont placées en chambre de culture pendant environ 10 jours à 22°C avec un cycle de photopériode de 16h de jour/8h de nuit. Les plantules sont ensuite cultivées dans des pots contenant du terreau et de la vermiculite dans des conditions de photopériode de 16h de jour/8h de nuit et de thermopériode de 22°C le jour et 18°C la nuit. Concernant le traitement à la Trichostatine A (TSA), les plantules sont placées dans des boîtes de Petri contenant du MS1/2 + 0,5µM de TSA et prélevées à 14 jours ou transférée en pots contenant le même milieu jusqu'à la floraison.

Tableau 3 : Liste des vecteurs utilisés au cours de cette étude.

Nom du plasmide	Type de vecteur	Promoteur	Résistance bactérie	Résistance plante	Tag	Taille	Particularité
pDNR201	Vecteur donneur Gateway	-	Kanamycine	-	-	4470	
pDNR207	Vecteur donneur Gateway	-	Gentamycine	-	-	4470	
Vecteurs d'entrées							
Localisation subcellulaire et BiFC (Transformation transitoire)							
pDEST-YFP-C-TER (804)	Vecteur de transformation transitoire	35S	Ampicilline	-	YFP C-ter	6500	
pDEST-YFP-N-TER (798)	Vecteur de transformation transitoire	35S	Ampicilline	-	YFP N-ter	6565	
pUGW0-Nter	Vecteur Gateway de transformation transitoire pour BiFC	35S	Ampicilline	-	nYFP-Nter	?	
pUGW0-Cter	Vecteur Gateway de transformation transitoire pour BiFC	35S	Ampicilline	-	nYFP-Cter	?	
pUGW2-Nter	Vecteur Gateway de transformation transitoire pour BiFC	35S	Ampicilline	-	cYFP-Nter	?	
pUGW2-Cter	Vecteur Gateway de transformation transitoire pour BiFC	35S	Ampicilline	-	cYFP-Cter	?	
pGWB660	Vecteur Gateway de surexpression	35S	Spectinomycine	Basta	TagRFP C-ter	12255	
pGWB661	Vecteur Gateway de surexpression	35S	Spectinomycine	Basta	TagRFP N-ter	12254	
Transformation stable des plantes							
pK7WG2D	Vecteur Gateway de surexpression	35S	Spectinomycine	Kanamycine	-	12794	35S:GFP
pH7WG2D	Vecteur Gateway de surexpression	35S	Spectinomycine	Hygromycine	-	13181	35S:GFP
pKGWFS7	Vecteur Gateway gène rapporteur	-	Spectinomycine	Kanamycine	-	12700	GUS-GFP
pK7GWWG2/I	Vecteur de silencing RNAi	35S	Spectinomycine	Kanamycine	-	13599	
pGWB14	Vecteur Gateway de surexpression	35S	Kanamycine, Hygromycine	Kanamycine, Hygromycine	3HA C-ter	17356	
pGWB15	Vecteur Gateway de surexpression	35S	Kanamycine, Hygromycine	Kanamycine, Hygromycine	3HA N-ter	17358	
pGWB17	Vecteur Gateway de surexpression	35S	Kanamycine, Hygromycine	Kanamycine, Hygromycine	4Myc C-ter	17407	
pGWB20	Vecteur Gateway de surexpression	35S	Kanamycine, Hygromycine	Kanamycine, Hygromycine	10Myc C-ter	17638	
pFPZP11	Vecteur de transformation par agrobacterium	-	Spectinomycine	Kanamycine	-	9014	
Expression en système bactérien							
pET300	Vecteur Gateway d'expression bactérien	T7	Ampicilline	-	6His Nter	7400	
Constructions amiRNA et Crispr/Cas9							
pRS300	Backbone for expressing plant artificial miRNAs	T7 T3	Ampicilline	-	-	3368	

Tableau 4 : Liste des antibiotiques utilisés pour la sélection des plantes et bactéries utilisés au cours de cette étude

Antibiotique	Concentration stock	Solution de solubilisation	Concentration utilisée pour les cultures bactériennes	Concentration utilisée pour la sélection des Tomate	Concentration utilisée pour la sélection d' <i>Arabidopsis</i>
Kanamycine	30mg/mL	H2O mQ	50µg/mL	150µg/mL	50µg/mL
Chloramphenicol	10mg/mL	Ethanol absolu	10µg/mL	-	-
Gentamycine	40mg/mL	H2O mQ	40µg/mL	-	-
Hygromycine B	50mg/mL	H2O mQ	20µg/mL	20mg/mL	20µg/mL
Spectinomycine	100mg/mL	H2O mQ	100µg/mL	-	-

Epiderme d'oignon

Les épidermes internes d'oignon, *Allium cepa*, sont utilisés pour la localisation de protéines d'intérêt et les analyses en BiFC (Bimolecular Fluorescence complementation) par microscopie confocale. Ils sont prélevés sur les écailles internes de jeunes bulbes d'oignon obtenus dans le commerce et déposés, face externe en contact avec du milieu MS avant d'être soumis au microbombardement par biolistique. Après microbombardement, les épidermes d'oignon sont incubés à 26°C à l'obscurité pendant 24h avant observation.

Souches bactériennes et milieux de culture

La souche d'*Escherichia Coli* (*E. coli*) TOP10 (Invitrogen) a été utilisée pour le clonage et la propagation des différents plasmides.

La souche d'*E. coli* DB3.1 est utilisée pour la propagation des plasmides Gateway® non recombinés, contenant l'opéron *ccdB*.

La souche d'*E. coli* Rosetta2 (Novagen) de génotype F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm pRARE2 (CamR) est utilisée pour la production de protéines recombinantes.

La souche GV3101 d'*Agrobacterium tumefaciens* est utilisée comme vecteur de transformation pour générer les plantes transgéniques.

L'ensemble des souches d'*E. coli* sont cultivées à 37°C et celle d'*Agrobacterium tumefaciens* est cultivées à 28°C. Toutes les souches bactériennes sont cultivées dans du milieu LB (Bactotryptone 1%(p/v); extrait de levure 0,5% (p/v); NaCl 1% (p/v)) en présence ou non d'antibiotiques. La nature et la concentration de l'antibiotique utilisé sont déterminées par le gène de résistance porté par le plasmide d'intérêt (**tableau 3 et 4**).

Méthodes de manipulation et d'analyse des acides nucléiques

Extraction des acides nucléiques

Extraction de l'ADN génomique d'*Arabidopsis thaliana* et de tomate

L'extraction d'ADN génomique d'*Arabidopsis* est réalisée sur de petits échantillons de jeunes feuilles de l'ordre de 100 mg selon la méthode d'Edwards (**Edwards *et al.* 1991**). L'ADNg ainsi obtenu est utilisé pour sélectionner les plantes transgéniques par criblage PCR.

L'extraction d'ADN génomique de tomate est effectuée à partir de jeunes feuilles à l'aide de la solution DNAzol (Sigma) en suivant les instructions du fournisseur.

Extraction des ADN plasmidiques de bactéries

L'ADN plasmidique est extrait à partir de 5mL ou de 50mL de culture en phase stationnaire de croissance, en utilisant respectivement les systèmes d'extraction PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega) ou le kit Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System (Promega), selon le protocole décrit par le fournisseur. L'ADN plasmidique est élué dans 50µL ou 500µL d'eau mQ stérile selon le système utilisé et quantifié par mesure d'absorbance à 260 nm via un spectrophotomètre

Extraction d'ARN totaux et rétrotranscription

Les extractions d'ARN ont été réalisées à l'aide de la solution TRIZOL (Sigma) en suivant le protocole du fournisseur pour l'extraction des ARN. Pour chaque lignée étudiée, des triplicatas biologiques sont réalisés. Les ADN contaminants sont éliminés en traitant les extraits à l'aide du kit RQ1 RNase-free DNase (Promega). La qualité des ARN est contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose. Les ARN sont dosés à l'aide d'un spectrophotomètre Nanovue® (GE Healthcare). Afin de contrôler la présence de contaminations par de l'ADN, une PCR est réalisée sur les échantillons d'ARN avec des amorces ciblant la séquence du gène de référence *ACTINE*. L'absence d'amplification permet de considérer la contamination comme négligeable et n'ayant pas d'impact pour les analyses d'expression.

Tableau 5 : Liste des amorces utilisées pour la PCR en temps réel

Amorce	Gène ciblé	Sequence (5' to 3')
QAtEF1FW	elongation factor 1- α (AT5G60390)	GTGAAGAAGGGTGCCAAATG
QAtEF1REV		GCTCAAACGCCATCAAAGTT
QAtTUBFW	Tubulin β -2/ β -3 chain (AT5G62690)	AACGCTGACGAGTGTATGGTTTT
QAtTUBREV		CCAAAGGTAGGATTAGCGAGCTT
QMIF1FW	MIF1 (AT1G74660)	GTTGATACTGAGGTTGTTTGTG
QMIF1REV		CTATAGATATAGATGGGCGGT
QMIF2FW	MIF2 (AT3G28917)	TTGGGGTTTGAGAATGTTTCAG
QMIF2REV		CCCAACCAGAATACAAATCAAAA
QMIF3FW	MIF3 (AT1G18835)	TCGGGAGATCAGTTTACGAAG
QMIF3REV		ACGGACGTTGCTTGAAGAAG
QWUSFW	WUSCHEL (AT2G17950)	TGAAGATCACATCAACGGTGG
QWUSREV		AGCATAGTTGTGAACATACGAG
QAGFW	AGAMOUS (AT4G18960)	CCGATCCAAGAAGAATGAGCTCTT
QAGREV		CATTTTCAGCTATCTTTGCACGAA
QSIACFW	SIACTIN2	GGACTCTGGTGATGGTGTAG
QSIACREV		CCGTTTCAGCAGTAGTGGTG
QSIeIF4FW	SIEIF4e	AGTGGACGATTTGGAAGGAAG
QSIeIF4REV		GCTCCTCGATTACGACGTTG
QIMAFW	IMA (Solyc02g087970)	TTCCCTATTTGGAAGCTTGTGT
QIMAREV		CGATTTACACCTTATTCACAC
QTAG1FW	TAG1 (Solyc02g071730)	CTTGATGCCAGGGAGTTCAT
QTAG1REV		ATCGAATTGCTGAGGTGGAG
QSIWUSFW	SIWUS (Solyc02g083950)	CCCATGTGAAGATGGTGATG
QSIWUSREV		CTTCCATGCAAATGATTCCA
QSIKNUFW	SIKNUCKLES	AAGCACTTGGAGGACATCAG
QSIKNUREV		TATTGTTTGAAGGAGGCGGT
QIMAchFW	IMAch (Solyc02g087970)	ATGAGGAGAGTGAGATATGTTGAG
QIMAchREV		AGAGACTGGTGATTTTCAGCG
QZHD3FW	ZHD3	ATGTGCACCTTTCTGCTGGT
QZHD3REV		TAACAACAATCTGAACTTAACTAAGGA
QZHD5FW	ZHD5-2	GAAACCACCAACACCAACAA
QZHD5REV		CAAAAACCTAGAAGAAGGAAAACA
QZHD7FW	ZHD7	CAAGCAAGCAATGAAGAGAAA
QZHD7REV		TTGAATAATTTGAAGGGCAAAAA
QZHD8FW	ZHD8	GAAGAGCTAACGGCGGAGTA
QZHD8REV		GACGCTTTTTCAACGCTTTC
QZHD9FW	ZHD9	GTGGTGGTGGGAGATTTGAG
QZHD9REV		CTTCCCTGCAAAAACGACAT
QZHD13FW	ZHD13	CTGAGAGGCAGGAGGAGGTT
QZHD13REV		CCTTGTGATTATTCATCCAATCC
QZHD14FW	ZHD14	GAAGTTGGGATGGACGTTGA
QZHD14REV		CGAGTAACACCAATCCCTTCA
QSIMIF6FW	SIMIF6	CGTGAGATACAAAGAGTGCCA
QSIMIF6REV		GATGCAACTTCAGTTTCCACC
QSIMIF7FW	SIMIF7	GAAGAGAATGATGGCTCATTGC
QSIMIF7REV		GCAACTTCAGTTTCCACTTCC
QPIFW	PISTILLATA	TGGGTAGAGGAAAGATCGAG
QPIREV		CTTCAAATGCCTGAGCTCCA

Les réactions de rétrotranscription (RT) ont été réalisées à l'aide du kit iScript™ One-Step RT-PCR Kit for Probes (Biorad) à partir d'un µg d'ARN selon les recommandations du fournisseur.

Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Les réactions de PCR de routine sont réalisées avec la GoTaq® DNA Polymerase (Promega) selon les conditions préconisées par le fournisseur à partir d'ADNg, d'ADNc ou d'ADN plasmidique purifié. Dans le cas des amplifications avant séquençage, les PCR ont été réalisées avec le kit PrimeStarMax (Takara) afin de minimiser le risque d'erreurs de séquence.

PCR en temps réel

Les préparations des échantillons pour les analyses en PCR quantitatives (qPCR) sont réalisées en utilisant le master mix du kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) selon les conditions conseillées par le fournisseur. Les réactions de qPCR sont réalisées sur un thermocycleur CFX96 Biorad™. Pour chaque gène étudié et afin d'évaluer l'efficacité de la réaction, une gamme de dilution est réalisée à partir du produit de qPCR correspondant purifié. Les échantillons de cette gamme sont soumis aux mêmes conditions de qPCR. Les amorces utilisées pour la qPCR sont listées dans le **tableau 5**.

La normalisation de l'expression est réalisée à partir de deux gènes de références (*ACTINE3* et *EF1α* chez *Arabidopsis* et *SITUBULINE4* et *SLEIF4* chez la Tomate) choisis pour leurs niveaux d'expression relativement constants. Des triplicatas techniques sont réalisés sur chaque échantillon. Les écarts-types sont calculés à partir des différentes moyennes obtenues à partir des répliquats biologiques. Le test t de Student a été utilisé afin d'évaluer si des différences significatives entre les moyennes sont observées. Les résultats sont donc exprimés en unité arbitraire d'expression relative.

Immunoprécipitation de chromatine

Les expériences de CHIP ont été effectuées sur des plantules d'*Arabidopsis* de 7 jours issues de culture *in vitro* en utilisant les anticorps anti-HA (Santa Cruz rabbit polyclonal) ou anti-IgG (Millipore) d'après le protocole décrit par Jégu *et al.* en 2013. Après fixation de 2 à 3g de plantules dans 37mL d'une solution de formaldéhyde 1% (v/v) pendant 15minutes sous un vide ménagé puis arrêt de la fixation par ajout de 2,5mL de glycine 2M les échantillons sont rincés et congelés dans l'azote liquide avant extraction de la chromatine. La chromatine extraite est soniquée à l'aide du Bioruptor UCD-200 (Diagenode) par pulse de durée 30s-on/30s-off à intensité haute pendant 60 min. La qualité de la sonication est contrôlée sur gel d'agarose après extraction phénol/chloroforme afin de s'assurer de la taille des fragments obtenus. Si la sonication est correcte, la chromatine est utilisée pour l'immunoprécipitation. Les complexes protéine-ADN sont immunoprécipités à l'aide des anticorps une nuit à 4°C sous agitation. Les complexes sont alors isolés à l'aide du kit Dynabeads Protein A (Invitrogen; 100-02D) puis l'ADN immunoprécipité est purifié à l'aide du kit CHIP DNA Clean & Concentrator (Zymo Research) afin d'être utilisé pour la PCR en temps réel. Un aliquot de chromatine soniquée subit le même traitement et servira d'input.

Tableau 6 : Liste des amorces utilisées pour l'hybridation *in situ*

Synthèse des sondes pour l'hybridation <i>in situ</i>		
Amorce	Gène ciblé	Sequence (5' to 3')
HIS-MIF2FW	MIF2 (AT3G28917)	tgtaatacgactcactataggctTTGAAGGTGGTGAAG
HIS-MIF2REV		tgtaatacgactcactataggctGACCCAACCAGAATAC
HIS-WUSFW	WUSCHEL (AT2G17950)	tgtaatacgactcactataggctGGTACTGAATGTGGT
HIS-WUSREV		tgtaatacgactcactataggctAGGCTTTGCTCTATC
HIS-SIKNUFW	SIKNUCKLES	TGTAATACGACTCACTATAGGGCTAAGCACTTGGAGGACATCAG
HIS-SIKNUREV		TGTAATACGACTCACTATAGGGCTTATTGTTTGAAGGAGGCGGT

Hybridation *in situ*

Synthèse et marquage des ribosondes

Les hybridation *in situ* des ARNm ont été effectuées en utilisant des ribosondes marquées à la digoxygénine-UTP suivant le protocole décrit dans **Bisbis *et al.*, 2006**.

Afin de synthétiser les ribosondes pour l'hybridation *in situ*, la séquence correspondant à la ribosonde est amplifiée par PCR en utilisant des amorces portant en 5' la séquence du promoteur T7, permettant de créer les matrices pour les ribosondes sens et antisens. Les amorces utilisées sont listée en **Tableau 6**. La synthèse des ribosondes est effectuée par transcription *in vitro* en utilisant le kit DIG RNA Labeling (SP6/T7) de Roche Applied Science (Catalog Number 11175025910) selon le protocole du fournisseur.

Préparation des tissus

La préparation des inflorescences d'*Arabidopsis thaliana* et de tomate a été réalisée selon le protocole décrit dans **Sicard *et al.* 2008** adapté de **Meyerowitz *et al.*, 1987**.

Les échantillons sont ensuite inclus en paraffine (paraplast+) puis les coupes de 8 μm d'épaisseur sont effectuées au microtome.

Hybridation des ribosondes et révélation

L'hybridation *in situ* des ribosondes est réalisée suivant le protocole décrit dans **Sicard *et al.* (2008)**.

Montage des coupes et observation microscopique

Après déparaffinage et ré-hydratation, les lames portant les coupes colorées sont séchées et recouvertes d'une lamelle montée à l'aide d'une solution d'Entellan (Merck). Les observations microscopiques sont effectuées à l'aide d'un microscope Zeiss Axioplan et l'acquisition des images est effectuée à l'aide d'une caméra numérique (Moticam 2300 3.0 M pixel, Motic).

Tableau 7 : Liste des amorces utilisées pour les clonages (première partie)

Amorce	Gène ciblé	Sequence (5' to 3')	
IMAattB1FW	IMA (Solyc02g087970)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTAGAAGAGATGAAAAAGTTTTGAGG	
IMAattB2REV		GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCATTTAGTAGTAGAAGA	
IMAattB2REVNS		GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTCCGCTTCTTCTACTACTAAA	
IMAAsp12FW		ATGAAAAAAGTTTTGAGGAGAAATGATTACGATAGAAATGATACAAAT	
IMAAsp1234FW		ATGAAAAAAGTTTTGAGGAGAAATGATTACGATAGAAATGATACAAATGATGACTTT AC	
IMAAla12FW		ATGAAAAAAGTTTTGAGGAGAAATGATTACGCTAGAAATGCCACAAAT	
IMAAla3456FW		ATGAAAAAAGTTTTGAGGAGAAATGATTACGCTAGAAATGCCACAAATGCTGCCTTT AC	
MIF2attB1FW	MIF2 (AT3G28917)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTAATGAGGAAGCGTCAGG	
MIF2attB2REV		GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCTAATTTCCAGTAGAAGG	
MIF2attB2REVNS		GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTATTTCCAGTAGAAGG	
MIF2Asp12FW		AGGTGGTGTGAGGAGAGCCGATCCAGAGGAACCTGATAGAAGCTCGTCCG	
MIF2Asp3456FW		GAGGAACCTGATAGAGATGACGATACGGCTGATGACCTGACAGTGAGAACT	
MIF2Ala12FW		AGGTGGTGTGAGGAGAGCCGATCCAGAGGAACCTGATAGAAGCTCGTCCG	
MIF2Ala3456FW		GAGGAACCTGCTAGAGCTGCCGCAACGGCTGCTGCCTGACAGTGAGAACT	
MIF2ZFFW		GTGAGGTACGGAGAATGTC	
MIF2ZFattB1FW		GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTAGTGAGGTACGGAGAATGTC	
MIF2ZFREV		TTCTATTTCTCTCCGATGGAACT	
MIF2ZFattB2REV		GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTCTATTTCTCCGATGGAAAC	
KNUattB1FW		KNUCKLES (AT5G14010)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTAATGGCGGAACCACCACCG
KNUattB2REV			GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTATAACGGAGAGAAAGGTCT
KNUZfdelFW	ATGAACCTCGGCGTCCT		
KNUZfdelattB1FW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTAATGAACCTCGGCGTCCT		
KNUEARdelREV	TTAAGGTACACATACGGATAC		
KNUEARdelREVNS	AGGGTACACATACGGATACG		
KNUEARdelAttb2REV	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTAAGGTACACATACGGATAC		
KNUEARdelAttb2REV	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTAGGGTACACATACGGATACG		
SIKNUattB1FW	SIKNUCKLES	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTATGGCGGACCACACCC	
SIKNUattB2REV		GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCTACAAACGAAGGTAAGGTCCG	
pIMAAttb1FW	IMA promoter (Solyc02g087970)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTAATCATCAGTGAGGGCCA	
pIMAAttb2REV		GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCTCTCTAATGATTAGATAAATG	
SIKNU-RNAiattB1FW	SIKNUCKLES	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTGACCCTAACAATAACAATAATAGG	
SIKNU-RNAiattB2REV	hairpin	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTAGATTAGCTGGGGTTCA	
SIHDA1Attb1FW	SIHDA1 (Solyc09g091440)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTAATGGATGTTGGAGGAAACTC	
SIHDA1Attb2REV		GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTAGGAGATAATATCAGTTGGTTG	
TPLattB1FW	TPL (AT1G15750)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTAATGTCCTCTCTTAGTAGAGAGCT	
TPLattB2REV		GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCATCTCTGAGGCTGATCAG	
ZHD4FW	ZHD4	ATGGAATTGCAAGTCAAGA	
ZHD4REV		TCATGGGACGATCTTAGTCA	
ZHD4Attb1FW		GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTAATGGAATTGCAAGTCAAGA	
ZHD4attB2REV		GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCATGGGACGATCTTAGTCA	
ZHD4attB2REVNS		GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTGGGACGATCTTAGTCA	

Clonage moléculaire

Clonage moléculaire par recombinaison selon la technologie Gateway®

Des vecteurs Gateway® (Invitrogen) ont été utilisés dans cette étude. Ils permettent l'insertion de gènes d'intérêt par recombinaison trans entre des sites spécifiques portés par deux vecteurs.

Amplification de la séquence d'intérêt et insertion dans les vecteurs d'entrée

La séquence d'intérêt destinée à être insérée dans le vecteur de destination est obtenue à partir d'ADNc d'Arabidopsis ou de tomate par amplification PCR à l'aide de l'ADN polymérase haute fidélité PrimeStarMax (Takara) selon les recommandations du fournisseur.

Le clonage du fragment attB-PCR purifié dans le vecteur d'entrée pDONR™ 201 ou pDONR™ 207 est réalisé grâce à la réaction de "recombinaison BP" selon le protocole du fournisseur (Invitrogen). Les bactéries transformées sont sélectionnées sur milieu LB en présence d'antibiotique dont la nature dépend du plasmide utilisé (**tableau 4**).

Clonage dans les vecteurs de destination

Le clonage est réalisé par recombinaison dite "LR". Il permet de transférer la séquence d'intérêt dans différents vecteurs de destination. Cette réaction s'effectue sur le plasmide produit de la "recombinaison BP" après sélection et amplification des clones recombinants. La réaction est réalisée selon les recommandations du fournisseur (Invitrogen). La présence de la séquence d'intérêt dans le plasmide porté par les bactéries sélectionnées est évaluée par PCR. Puis la séquence du fragment inséré est déterminée par séquençage.

Tableau 8 : Liste des amorces utilisées pour les clonages (deuxième partie)

Amorce	Gène ciblé	Sequence (5' to 3')
ZHD11FW	ZHD11	ATGGATTTGTCTTCCAAACCAC
ZHD11REV		CAAGAAGATGAAGACCCATC
ZHD11AttB1FW		GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGATTGTCTTCCAAACCAC
ZHD11attB2REV		GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCAAGAAGATGAAGACCCATC
ZHD11attB2REVNS		GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTAGAAAGATGAAGACCCATCAC
ZHD9FW	ZHD9	ATGCTTGAAGTTAGATCAATGG
ZHD9REV		TCACGACGAAGACGACGA
ZHD9AttB1FW		GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGCTTGAAGTTAGATCAATGG
ZHD9attB2REV		GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCACGACGAAGACGACGA
ZHD9attB2REVNS		GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCGACGAAGACGACGA
MIF1FW	MIF1 (AT1G74660)	ATGATGAAGAAGAGACAGATGGTA
MIF1REV		TCAAGCGTTAGGTGGAGAAT
MIF1AttB1FW		GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGATGAAGAAGAGACAGATGGTA
MIF1AttB2REV		GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCAAGCGTTAGGTGGAGAAT
MIF1AttB2REVNS		GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTAGTATTCTCCACCTAACGCT
MIF3FW	MIF3 (AT1G18835)	ATGAAGAAGAGGCAAGTGGT
MIF3REV		TCAGTTGTTTGCATTCGGAG
MIF3AttB3FW		GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGAAGAAGAGGCAAGTGGT
MIF3AttB2REV		GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCAGTTGTTTGCATTCGGAG
MIF3AttB2REVNS		GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGTTGTTTGCATTCGGAGGAG
ZHD8FW	ZHD8	ATGGATGTAATAGCTACTACAACCT
ZHD8REV		TCAGTCTGAAGAAAACGAC
ZHD8AttB1FW		GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGGATGTAATAGCTACTACAACCT
ZHD8attB2REV		GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCAGTCTGAAGAAAACGAC
ZHD8attB2REVNS		GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGCTGAAGAAAACGAC
ZHD13FW	ZHD13	ATGGATGAGATAAAACCAAAGA
ZHD13REV		TCATTCATCAATTATAATTTTATCCT
ZHD13AttB1FW		GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGGATGAGATAAAACCA
ZHD13attB2REV		GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCATTCATCAATTATAATTTTATCCT
ZHD13attB2REVNS		GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCATCAATTATAATTTTATCCT
SUPFW	SUPERMAN	ATGGAGAGATCAAACAGCATAG
SUPREV		TTAAGCGAAACCCAAACGG
SUPREVNS		AGCGAAACCCAAACGGAG
SUPAttb1FW		GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGGAGAGATCAAACAGCATAG
SUPAttB2REV		GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTAAAGCGAAACCCAAACGG
SUPAttB2REVNS		GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGCGAAACCCAAACGGAG
Solyc02g067330FW	SIMIF6 (Solyc02g067330)	ATGAGAAAAATTCAACTGTTTG
Solyc02g067330REV		CTAAAACAGCACACAAGAAG
Solyc02g067330attB1FW		GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGAGAAAAATTCAACTGTTTG
Solyc02g067330AttB2REV		GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCTAAAACAGCACACAAGAAG
Solyc03g061620FW	SIMIF7 (Solyc03g061620)	ATGACAAAACGTCATGAAGA
Solyc03g061620REV		TTAAGACGGGGAGGAGCA
Solyc03g061620AttB1FW		GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGACAAAACGTCATGAAGA
Solyc03g061620AttB2REV		GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTAAAGACGGGGAGGAGCA

Vecteurs de destination utilisés

Vecteurs utilisés pour l'expression transitoire en épiderme d'oignon et pour le BiFC

Vecteurs pBS-35S-YFP-attR, pBS-35S-attR-YFP, p2CGW7, p2GWC7, pGWB660, pGWB661

Ces vecteurs sont utilisés pour étudier la localisation de protéines fusionnées à la Yellow Fluorescent Protein (YFP), à la Cyan Fluorescent Protein (CFP) ou à la Red Fluorescent protein (RFPTag). La séquence codante pour la protéine d'intérêt est fusionnée en amont ou en aval de la séquence codante de la eYFP de la CFP ou de la RFPTag en fonction de l'orientation des sites attR par rapport aux extrémités de la protéine fluorescente. Les séquences sont transcrites sous le contrôle du promoteur 35S. Les vecteurs portent le gène conférant la résistance à l'antibiotique ampicilline (AmpR) pour la sélection des bactéries transformées utilisées pour l'amplification du plasmide.

Vecteurs NeYFP/pUGW2, CeYFP/pUGW2, NeYFP/pUGW0 et CeYFP/pUGW0

Ces vecteurs sont utilisés pour les expériences de BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation). Ils permettent l'expression de protéines fusionnées à des fragments de la protéine eYFP fonctionnellement complémentaires pour l'émission du signal fluorescent. En effet, la protéine eYFP de 239 acides aminés est séparée en deux formes, la NeYFP correspondant aux 175 premiers acides aminés et la CeYFP portant les 64 acides aminés restants. Les séquences codantes de la NeYFP et de la CeYFP peuvent être fusionnées en 5' (vecteurs dont les noms se terminent par 0) de la séquence codante de la protéine d'intérêt ou en 3' (vecteurs dont les noms se terminent par 2) de la séquence codante de la protéine d'intérêt. Les séquences ainsi obtenues sont sous la dépendance du promoteur CaMV 35S. Ces vecteurs possèdent le gène AmpR pour la sélection des bactéries transformées.

Liste des séquences codantes clonées en vecteur d'entrée (pDONR201 ou pDONR207) :

A. thaliana

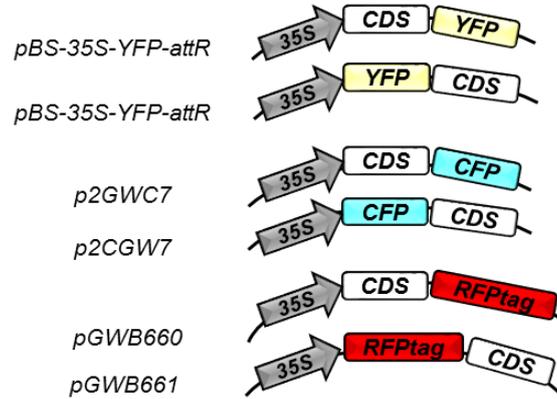
- CSN5
- HDA19
- IAA17
- KNU
- MIF1
- MIF2
- MIF3
- PAA1
- PBB1
- SUP
- TPL
- ZHD3
- ZHD5
- ZHD8
- ZHD11

Tomate

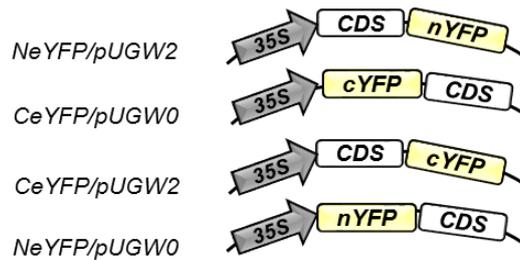
- IMA
- SITPL3
- SIHDA3
- SIKNU
- TAG1
- Prom IMA
- SIKNU-RNAi

Vecteurs de destination utilisés :

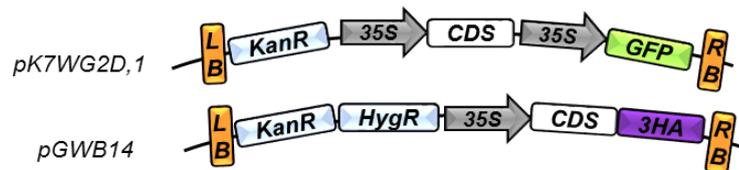
Transformation transitoire : Localisation sub-cellulaire



BiFC



Transformations stable



RNAi



Gène rapporteur



Figure 80: Listes des constructions plasmidiques obtenue par la technologie Gateway®

A gauche : liste des séquences clonées dans des vecteurs d'entrée.

A droite : représentation schématiques des portions de vecteurs de destination pouvant contenir les cassettes d'intérêt.

Vecteurs utilisés pour la transformation stable des plantes

Vecteur de surexpression

Les plasmides pK7WG2D,1 et pGWB14 (tag-HA) ont été utilisés pour la transformation d'*Arabidopsis thaliana* et de tomate par *Agrobacterium tumefaciens*. Ces vecteurs permettent la surexpression du gène d'intérêt inséré au niveau de sites de recombinaison pour le clonage de type Gateway®. Il s'agit de vecteurs binaires contenant entre les sites LB et RB de l'ADN-T, les séquences du promoteur constitutif CaMV 35S et du terminateur du gène VI du CaMV entre lesquelles sont insérés des sites de recombinaison attR Gateway® bordant les gènes Cmr et ccdB. Le pGWB14 contient en 5' de la séquence codant pour l'extrémité N-terminale de la protéine d'intérêt, la séquence codant le tag-HA permettant d'étiqueter la protéine pour les immunoprécipitation. La sélection des plantes est permise grâce au gène de sélection conférant la résistance à la kanamycine (KanR) seule (pK7WG2D,1) ou à l'hygromycine (pGWB14).

Construction *pPI::amiRNA-MIF2*

Les 1735-pb de la séquence *pPI::amiRNA-MIF2-t35S* contenant 800-pb du promoteur du gène homéotique *PISTILLATA* d'*A. thaliana*, 701-pb du amiRNA et 222-pb du terminateur du gène VI du CaMV encadrés par les sites de restriction EcoRI et BamHI) ont été synthétisés par Eurofins. L'ensemble de la cassette a été clonée dans un vecteur de destination pPZP212 via une réaction de digestion/ligation utilisant les enzymes de restrictions EcoRI et BamHI.

Vecteurs utilisés pour la production de protéines en bactérie

Les plasmides pET300-NT et pDEST15 sont des vecteurs d'expression de protéines étiquetées respectivement par les étiquettes 6x-Histidine (6xHis) et glutathione S-transferase (GST), lesquelles permettent de purifier les protéines d'intérêt. Ces vecteurs contiennent le promoteur et le terminateur T7 du bactériophage du même nom. Ils possèdent tous deux une séquence Shine-Dalgarno (RBS) suivie d'un codon start et de leurs étiquettes respectives permettant une fusion de l'étiquette à l'extrémité N-terminale de la protéine. Ces vecteurs portent tous deux le gène Ampr.

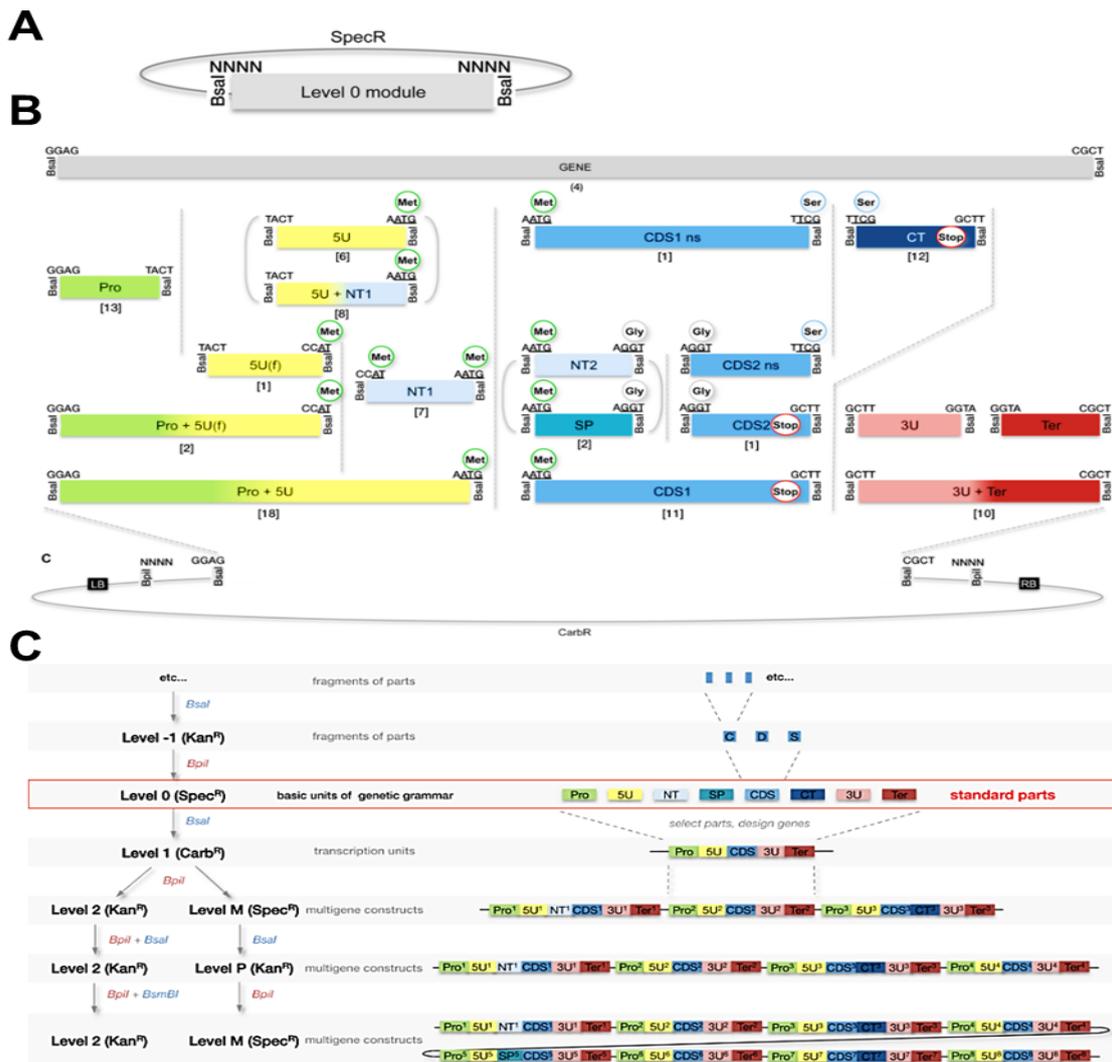


Figure 81: Principe du clonage via la technologie Modular Cloning (Moclo) d'après Engler *et al.*, 2014

(A) Vecteur de niveau 0. Ce sont les vecteurs d'entrée permettant d'accueillir les différents modules que l'on souhaite cloner. Dix-sept modules différents existent et permettent la création d'unités transcriptionnelles (TU). Les modules sont composés des éléments suivants : Pro : promoteur, 5U (séquence 5' non-traduite), 5U(f) : séquence 5' non traduite pour fusion N-terminale, NT : tag N-terminal ou signal de localisation sub-cellulaire, SEP (peptide signal), CDS (séquence codante), CT : C-terminal tag ou signal de localisation sub-cellulaire, 3U ; séquence 3' non traduite, Ter : terminateur, ns ; absence de codon stop.

(B) Assemblage des parties composant une unité transcriptionnelle d'intérêt. Les séquences d'intérêt sont clonées dans les vecteurs d'entrée de niveau 0. Les plasmides recombinants sont ensuite assemblés pour former une TU complète au sein d'un vecteur de niveau I. Le nombre de modules délivrés dans le kit «Plant Part» d'addgene est indiqué entre crochet au-dessus de chaque module. L'assemblage des différentes parties qui compose la TU es réalisé grâce à une réaction de digestion/ligation faisant intervenir l'enzyme de restriction BsaI. Tous les vecteurs de destination comprennent les séquences LB et RB permettant la transformation stable des plantes par *A. tumefaciens*.

(C) Ensemble des étapes du clonage par MoClo. La création des modules nécessite au préalable une étape de domestication consistant en l'élimination des sites de restrictions BsaI et BpI au sein des séquences d'intérêt. Cette étape est réalisée par création de mutations silencieuses par PCR. Les différentes parties amplifiées par PCR sont clonées dans des vecteurs de niveau -1. La combinaison des vecteurs de niveau -1 permet l'obtention des unités appelées modules à l'origine de la construction des TU. L'assemblage des modules permet le clonage de TU dans des vecteurs de niveau 1. Plusieurs TU peuvent être ainsi associées au sein de vecteurs de niveau 2.

Clonage moléculaire par recombinaison selon la technologie GoldenGate pour le CRISPR/Cas9

Les constructions pour la mutagenèse dirigée par CRISPR/Cas9 ont été réalisées en utilisant la méthode de clonage par Golden Gate (**Weber *et al.*, 2011**). L'ensemble des vecteurs nécessaires ont été commandés auprès d'Addgene (www.addgene.org).

La stratégie employée correspond à l'utilisation de deux sgRNA ciblant deux séquences séparées de 5 à 50pb afin d'obtenir des délétions de petite taille. Les vecteurs de niveau 1 contenant les sgRNAs placés sous le contrôle du promoteur U6 d'*Arabidopsis thaliana* ont été assemblés comme décrits dans **Belhaj *et al.*, (2013)**.

Les vecteurs de niveau 1 suivants, *pICH47732::NOSp::NPTII* (Addgene n°51144) contenant la cassette de résistance à la kanamycine pour la sélection des plantes transformées, *pICH47742::35S::hcoCas9* (Addgene n°49771) contenant la séquence codant la Cas9 dont les codons ont été optimisés pour une expression dans les cellules humaines, *pICH47751::AtU6p::sgRNA1* contenant le premier ARN guide, *pICH47761::AtU6p::sgRNA2* contenant le second ARN guide, et le linker *pICH41780* (Addgene no. 48019) permettant la fermeture du plasmide autour des 4 cassettes précédentes ont été assemblés dans le vecteur de niveau 2 *pAGM4723* (Addgene n°48015) comme décrit dans **Weber *et al.* (2011)**.

Transformation de E. Coli par électroporation

La transformation est effectuée par électroporation en utilisant le MicropulserTM (BioRad). Quarante µL de bactéries électrocompétentes sont décongelés dans la glace et additionnés à 1µL du mélange de produit de ligation ou à une certaine quantité de plasmides. Le mélange, placé dans une cuve à électroporation (fente 1 mm), est soumis à une impulsion électrique de 1800 Volt et d'environ 5 millisecondes. Les bactéries sont ensuite incubées dans 1mL de milieu LB, sous agitation (200 rpm), pendant 45 min à 37°C. Une fraction de la culture est étalée sur du milieu LB solide additionné de l'antibiotique de sélection approprié.

Production et purification de protéines recombinantes en bactérie

Les protéines d'intérêt fusionnées en N-terminal avec l'étiquette 6XHis ou GST, ont été produites chez la souche BL21-AI d'*E. coli* en utilisant le protocole suivant. Une colonie bactérienne obtenue après l'étape de transformation est mise en culture dans 5mL de milieu

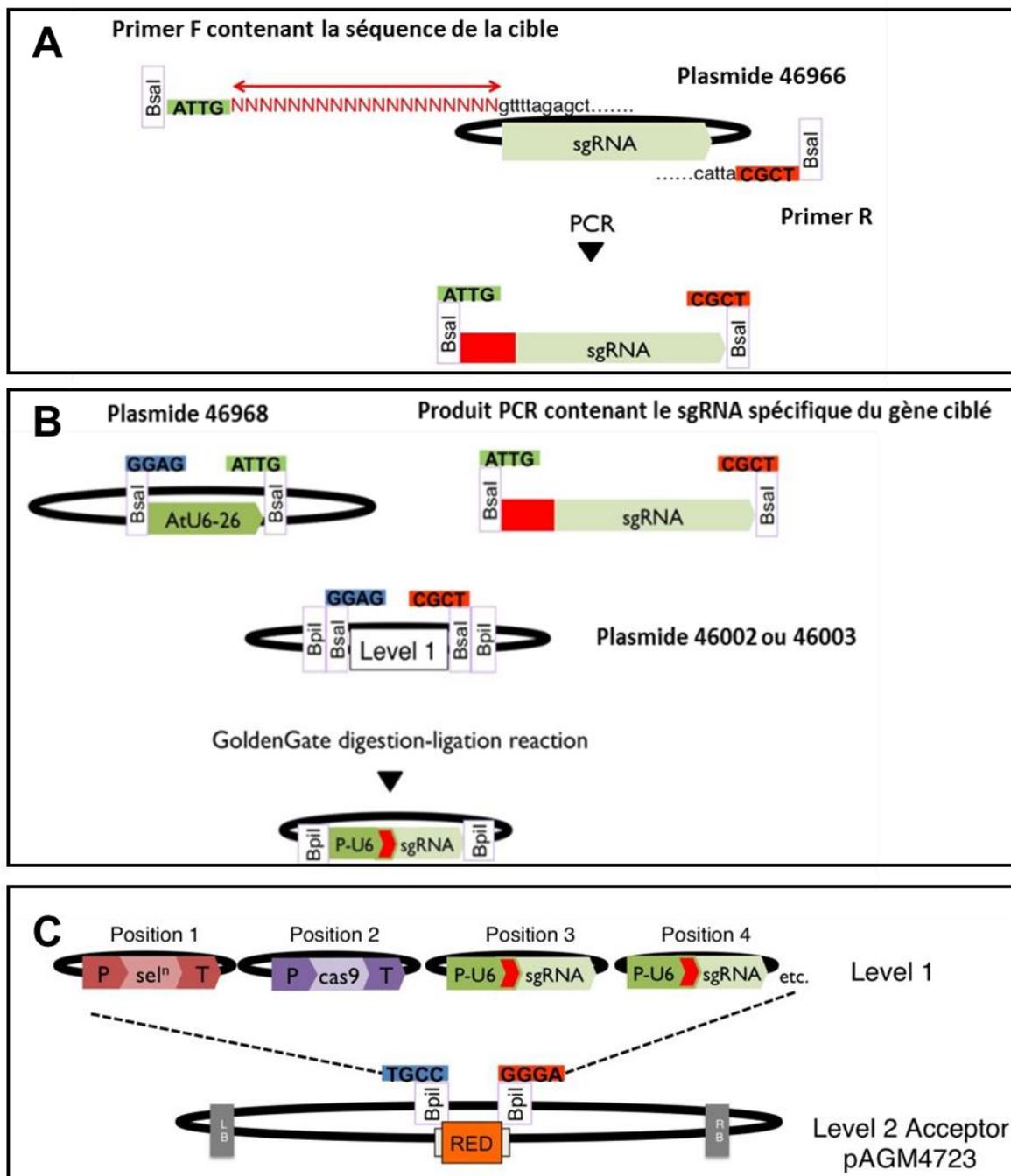


Figure 82 : Construction des vecteurs de transformation pour le CRISPR/Cas9 via la technologie MoClo

- Synthèse des sgRNA ciblant la séquence d'intérêt. Le primer sens utilisé contient les 20 nucléotides spécifiques du gène ciblé (en rouge) ainsi qu'un site Bsal en amont permettant le clonage (en bleu) et une portion complémentaire au sgRNA. Le vecteur pICH86966::AtU6p::sgRNA_PDS (addgene #46966) contient la séquence du sgRNA et sert de base à la synthèse par PCR.
- Clonage du sgRNA sous la dépendance du promoteur U6 dans un vecteur de niveau 1. Les produits PCR et le vecteur contenant le promoteur U6-26 (plasmide addgene #46968) sont utilisés pour réaliser la réaction de digestion ligation vers un plasmide Goldengate de niveau 1 (#48002 pour le guide 1 et #48003 pour le guide 2).
- Clonage de l'ensemble des TU vers le vecteur de niveau 2. Le vecteur de destination correspond au vecteur pAGM4723 qui contient le gène de résistance à la kanamycine ainsi que l'opéron canthaxanthine permettant le criblage blanc/orange des bactéries portant le plasmide recombinant. La réaction de digestion ligation permet d'insérer les 4 TU nécessaires à la mutagenèse par CRISPR/Cas9. Une unité transcriptionnelle contenant le gène de résistance à la kanamycine. Une unité transcriptionnelle contenant le gène codant la Cas9 sous la dépendance du promoteur fort CaMV 35S. Les deux sgRNA sont sous la dépendance du promoteur U6.

LB additionné de 100 µg/mL d'ampicilline durant la nuit à 37°C et sous agitation (150 rpm). La DO de la culture est déterminée à 600 nm et un volume correspondant à 0,1 unité de DO est prélevé afin d'ensemencer une culture de 20mL de milieu LB additionné de 100 µg/mL d'ampicilline. Les bactéries sont remises en culture pour atteindre une DO de 0,4 à 600 nm. La culture est séparée en deux afin de conserver un extrait bactérien non induit utilisé comme témoin négatif. Afin de favoriser la solubilité des protéines qui ont tendance à former des corps d'inclusion, un choc thermique est pratiqué selon le protocole suivant : les bactéries sont placées à 42°C pendant 10minutes puis à 37°C pendant 30min et enfin à 4°C pendant 30min. La production de protéines est alors induite par ajout de 0,1mM d'IPTG dans le milieu de culture et sont placée à 20°C sur la nuit. Le lendemain les bactéries sont centrifugées durant 15 min à 8000 rpm et les culots bactériens sont congelés dans l'azote liquide et placés à -20°C.

Les protéines recombinantes isolées à partir d'extraits bactériens sont extraites et purifiées sur une colonne de nickel pour les protéines portant l'étiquette 6XHis, ou sur une colonne de glutathion pour les protéines portant une étiquette GST. Dans le premier cas, le système de purification «Protino®Ni-NTA» (Macherey Nagel) a été utilisé selon les recommandations du fournisseur. Dans le deuxième cas, une résine d'agarose liant le glutathion (Molecular Probes) a servi pour réaliser des colonnes de purification de 3 mL et la purification selon le protocole fourni.

Expériences de pull-down

Pour l'expérience de pull-down environ 2µg de protéine GST-MIF2 purifiée est ajouté à une solution de billes Ni-NTA sur lesquelles ont été préalablement fixé les proteines 6xHis-KNU. Après 6 lavages avec le tampon NPI-20 / wash buffer (50 mM NaH₂PO₄ (pH 8.0), 300 mM NaCl, 20 mM imidazole) l'éluion est effectuée grâce au tampon NPI-250/elution buffer (50 mM NaH₂PO₄ (pH 8.0), 300 mM NaCl, 250 mM imidazole).

Analyse des protéines par électrophorèse monodimensionnelle en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).

Vingt à cinquante microgrammes de protéines sont prélevés et mélangés au tampon de charge composé de 80 mM Tris HCl pH 6.8; 2% (p/v) SDS; 17% (v/v) glycérol; 0,05% (p/v) bleu de bromophénol et 3% (p/v) DTT. La préparation est incubée à 90-100°C pendant 5 min puis

Tableau 9 : Liste des amorces utilisées pour les constructions permettant la mutagenèse par la technique CRISPR/Cas9 et pour le séquençage des plantes mutées.

GoldenGLevel1FW		GAACCCTGTGGTTGGCATGCACATAC
GoldenGLevel1REV		CTGGTGGCAGGATATATTGTGGTG
GoldenGLevel2FW		GTGGTGTAACAAATTGACGC
GoldenGLevel2RREV		GGATAAACCTTTTCACGCC
GoldenGLevel2FWcas9		AGAATCGACCTCTCTCAGCT
MIF2G4FW	MIF2 (AT3G28917)	tgtggtctcaATTGGCGCACGTTAGCGCTGCCAgtttagagctagaaatagcaag
MIF2G5FW		tgtggtctcaATTGAACTGCGATGGCAGCCACgtttagagctagaaatagcaag
MIF2G6FW		tgtggtctcaATTGTGGGAGGTTACGCTGTTGAgttttagagctagaaatagcaag
MIF2G7FW		tgtggtctcaATTGCTGCCATCGCAGTTCCATgtttagagctagaaatagcaag
CRISPRREV		tgtggtctcaAGCGTAATGCCAACTTTGTAC
KNULG1	SIKNUCKLES	TgtggtctcaATTGGTGGTTCCAGCATAATATCgtttagagctagaaatagcaag
KNULG2		tgtggtctcaATTGAGAACATTCTAGATGAAGAgtttagagctagaaatagcaag
KNULD1		tgtggtctcaATTGGGTAAGGTCGAGATTCAGCgtttagagctagaaatagcaag
KNULD2		tgtggtctcaATTGAAAAATATCCATGATTCCGgtttagagctagaaatagcaag
KNULseqFWD1		CACCTAGTTTATGATTTCTGGA
KNULseqREV1		CTTGAGAAGTGCAGAACTTA
promIMAG1	IMA promoter (Solyc02g087970)	TgtggtctcaATTGCTGTATAAATATGCCTTCTgtttagagctagaaatagcaag
promIMAG2		TgtggtctcaATTGGTTTTCCAGATAAGCAAAAgtttagagctagaaatagcaag
IMAcDsG1	IMA (Solyc02g087970)	TgtggtctcaATTGTCGGTGGATACGTTATCGAgtttagagctagaaatagcaag
IMAcDsG2		TgtggtctcaATTGCCACCGCAATTTCCACAGAgtttagagctagaaatagcaag
MIF2cdsG1	MIF2 (AT3G28917)	TgtggtctcaATTGTTGAGGAGAGCCTCGCCAGgtttagagctagaaatagcaag
MIF2cdsG2		TgtggtctcaATTGAAGAACCACGCTGCGGCGGgtttagagctagaaatagcaag
Mif2cdsG3		TgtggtctcaATTGTTTCATGGCAAGCCGAGGAGgtttagagctagaaatagcaag
MIF2seqREV		AAACTGCGATGGCAGCCA
MIF2seqFW		CGAGAATTGAAGTGAGAAAGC
pIMAcseqFW	IMA promoter (Solyc02g087970)	GAAAGTCTTAGCTACTAATATATTG
pIMAcseqREV		TATGTGTTACTGGAAGCTAGAG
KNULseqFW2	SIKNUCKLES	AATAGCTTGTGCTCCTCCT
KNULseqREV2		TAATGCTCGCTAGTTCTAAAGA
IMACDSseqFW	IMA (Solyc02g087970)	AGTGAGATATGTTGAGTGCC
IMACDSseqREV		AAGCGGAAGTACATTAGAA

déposée sur le gel. Un marqueur de taille Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) est déposé afin d'évaluer la taille des protéines associées aux bandes observées. La migration s'effectue en utilisant le système d'électrophorèse «Mini-PROTEAN® II Cell» (Biorad) dans le tampon de migration (Tris 25mM, (Na₂)EDTA 1 mM, glycine 196 mM et SDS 0,1% (p/v)) à un voltage de 100V.

Révélation des protéines au bleu de Coomassie

Après électrophorèse, les protéines sont fixées et colorées par immersion du gel pendant 30 min dans une solution contenant 45% (v/v) méthanol, 10% (v/v) acide acétique et 0,3% (p/v) de bleu de Coomassie R250. Le gel est ensuite décoloré sur la nuit sous agitation dans une solution contenant 45% (v/v) méthanol et 10% (v/v) acide acétique.

Analyse par Western Blot

Afin de visualiser un profil protéique précis, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF à l'aide du système semi-sec Trans-Blot® turbo blotting system (Biorad) et des kits TRansblot turbo RTA transfer kit associés en suivant les indications du fournisseur.

Après transfert des protéines sur la membrane de PVDF, celle-ci est saturée par incubation pendant 1h sous agitation dans une solution de TBST (Tris HCl 20 mM, NaCl 135 mM, 0,2% (v/v) Tween 20, pH 7.6) supplémentée avec 3% (p/v) de lait écrémé en poudre. Suite à la saturation, la membrane est rincée trois fois 5min dans une solution de TBST avant d'être incubée durant la nuit à 4°C sous agitation avec l'anticorps primaire (anticorps de souris anti-GST (Santa Cruz)) dilué au 1000^{ème} dans la solution de lavage. Le lendemain, trois étapes successives de 5 min de lavage de la membrane dans du TBST sont effectuées avant l'incubation de celle-ci avec l'anticorps secondaire (anticorps de lapin anti IgG de souris lié à la protéine HRP (Cell signaling technology®) dilué au 100.000^{ème} dans la solution de lavage. L'incubation de la membrane s'effectuera à température ambiante, sous agitation pendant 1 heure. La membrane est ensuite lavée 3 fois 5 min dans du TBST. La révélation est effectuée en utilisant le kit ECL RevelBlot® Intense kit (Ozyme) selon les recommandations du fournisseur, puis la membrane est visualisée à l'aide du ChemiDoc™ MP System (Biorad).

Méthodes de transgénèse et de sélection des plantes transgéniques

Transgénèse et sélection des plantes d'Arabidopsis thaliana

Les différentes constructions sont introduites dans *Agrobacterium tumefaciens* souche GV3101 pMP90 (Koncz et Schell, 1986) par électroporation en utilisant un Micropulser™ (BioRad) générant une impulsion électrique de 2.5 kV et d'environ 5 ms puis les bactéries sont immédiatement incubées dans 1mL de milieu LB, sous agitation (200 rpm), pendant 45 min à 28°C. Une fraction de la culture est étalée sur du milieu LB solide additionné de chloramphenicol (10µg/mL) et de rifampicine (25µg/mL) ainsi que de l'antibiotique de sélection approprié au plasmide utilisé pour la transformation et placé à 28°C. Quarante-huit heures après, une des colonies est mise en culture en milieu LB liquide contenant les mêmes antibiotiques. Lorsque la suspension bactérienne atteint une DO_{600nm} comprise entre 0,6-1, elle est utilisée pour réaliser la transformation de plantes. La transformation des plants d'*Arabidopsis thaliana* est réalisée par trempage des fleurs selon le protocole suivant adapté de Clough et Bent (1998). Les cultures d'*A. tumefaciens* sont centrifugées à 5000 g pendant 10 min à 4°C et le surnageant est éliminé. Les culots bactériens sont alors repris dans une solution de transformation (MS ½, glucose 5% (p/v) Silwett L77 0,05% (v/v)) de façon à obtenir une DO_{600nm} de 0,8. Les hampes florales sont ensuite trempées dans cette solution tous les deux jours jusqu'à arrêt de production de nouvelles hampes florales puis les plantes sont laissées en chambre de culture jusqu'à l'obtention des graines.

Après transformation, les graines sont récoltées puis décontaminées selon le protocole précédent avant d'être semées sur du milieu MS ½ additionné de l'antibiotique approprié (voir tableau). Les plantules résistantes sont analysées par PCR et RT-PCR en temps réel pour vérifier respectivement l'insertion du transgène dans le génome de la plante et le niveau de transcription du transgène correspondant.

Les plantes transformées par les constructions de type CRISPR/Cas9 sont contrôlées pour la présence du transgène puis pour la présence de mutations par PCR permettant d'amplifier la région ciblée et de la séquencer.

Transgénèse et sélection des plantes de tomate

La transformation de tomate est effectuée à partir de fragments de cotylédons par agroinfection comme décrits dans Culiañez-Macia (2004). Les cotylédons de tomate WVA106 sont prélevés en conditions axénique à partir de plantules de 7 jours semées sur milieu MS1/4, coupés en 3 explants puis mis en culture sur milieu MS contenant 0.1 mg.L⁻¹ d'AIA (Acide indole-acétique) et 1 mg.L⁻¹ of de BAP (Benzyl amino-purine) pendant 48h. Les explants sont ensuite immergés pendant 30min dans une solution de MS contenant les bactéries *A. tumefaciens* transformées par le plasmide d'intérêt. Après élimination de l'excès de culture bactérienne sur du papier absorbant stérile, les explants sont co-cultivés sur du milieu MS contenant 0.1 mg.L⁻¹ d'AIA et 1 mg.L⁻¹ of de BAP pendant 48h. Les explants sont alors rincés 3 fois avec de l'eau additionné de Tween20 0,05% (v/v) et mis en culture sur milieu de sélection (MS additionné d'AIA à 0,1 mg/L, BAP à 1 mg/L, d'un mélange de Ticarciline et acide clavulanique (rapport 15/1) à 300µg/mL et de kanamycine à 150 µg/mL ou d'hygromycine à 25 µg/mL) jusqu'à la formation de cals. Les plantules se formant à partir des cals sont repiquées en pots contenant du milieu MS avec le mélange de Ticarciline et acide clavulanique (rapport 15/1) à 300µg/mL et de kanamycine à 150 µg/mL ou d'hygromycine à 25 µg/mL pour enracinement. L'intégration du transgène et son expression sont ensuite contrôlée par PCR et RT-PCR en temps réel pour vérifier l'intégration du transgène et son expression avant de transférer les plantes enracinées en serre.

Transformation transitoire des épidermes d'oignon par biolistique

Le protocole de transformation a été adapté à partir du protocole décrit par **Varagona et al. (1992)**. Pour ce faire, 2,5 µg d'ADN plasmidique de chaque construction sont mélangés à 25 µL d'une suspension (250 µg/µL) de microparticules d'or (diamètre = 0,6 µm) dans l'éthanol 50% (v/v) puis 25 µL de CaCl₂ 2,5 M et 10 µL de spermidine 0,1 M sont ajoutés. La suspension est agitée pendant 3 min. Les microparticules sont sédimentées pendant 10 min et le surnageant est éliminé. Les microparticules sont rincées dans 200 µL d'éthanol 70% (v/v) puis dans 200 µL d'éthanol 100% (v/v) avant d'être dispersées dans 30 µL d'éthanol 100% (v/v). Huit microlitres de la suspension de microparticules sont utilisés pour la transformation des cellules épidermiques d'oignon à l'aide du canon à particules PDE-1000He (Biorad).

Avant transformation, les épidermes d'oignon sont prélevés sur les écailles les plus internes du bulbe et déposés, face supérieure au contact avec le milieu MS supplémenté ou non avec 10 μ M d'acide indole-acétique (AIA), ou 10 μ M d'acide gibbérellique (GA3), ou avec 100 μ M de MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al, SIGMA-Aldrich, France). La transformation des cellules d'épiderme d'oignon se fait sous une pression de 710 mm Hg à une pression d'hélium de 1100 psi et à une distance de 6 cm.

Observation de la localisation subcellulaire, et de l'interaction *in vivo* par BiFC en microscopie

Les épidermes d'oignon, les plantules d'Arabidopsis, les feuilles de Tomate et les protoplastes de de tomate sont déposés entre lame et lamelle dans de l'eau mQ ou dans le milieu K3 pour les protoplastes. Les observations sont réalisées en utilisant un microscope à balayage laser confocal TCS SP2 (Leica) au sein du pôle d'imagerie du végétal de la plateforme du BIC (Bordeaux Imaging Center). Les longueurs d'onde d'excitation utilisées pour la CFP, la eYFP et la tagRFP sont respectivement de 458nm, 514nm et 543nm. Les fenêtres d'émission définies pour leur observation sont respectivement entre 465 et 500 nm pour la CFP, entre 525 et 600nm pour la eYFP et entre 580 et 650nm pour la tagRFP.

Révélation de l'activité β -glucuronidase.

La coloration GUS a été effectuée selon le protocole décrit par Mudunkothge and Krizek, 2014. Les échantillons à analyser sont prélevés et incubés pendant 10 min dans de l'acétone 90% (v/v), puis lavés deux fois avec la solution d'infiltration (tampon phosphate de sodium 50 mM pH=7,2; 0.5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 0.5 mM $K_4 Fe(CN)_6$ et Triton X-100 0,5% (v/v)) en absence de substrat. Les échantillons sont ensuite soumis à une infiltration sous vide pendant 10 min en cassant le vide trois fois dans la solution d'infiltration contenant 0,1 % (p/v) de X-gluc (acide 5-Bromo-6-chloro-3-indoxyl- β -D-glucuronique), utilisé comme substrat de la β -glucuronidase. Enfin, les échantillons sont incubés pendant 12 à 24 heures à 37°C et les tissus sont déshydratés et décolorés avec des concentrations d'éthanol croissantes puis observés au stéréomicroscope. Les échantillons sont ensuite placés dans des solutions d'histosol de concentrations croissantes avant d'être inclus en paraffine. Des coupes de 12 μ m ont été

réalisées au microtome et fixées sur lame avant d'être déparaffinées. Elles ont été observées sous un microscope Zeiss Axioplan et les images acquises à l'aide d'une caméra Moticam 3 camera (Motic®).

Numéros d'accessions des genes étudiés

Les informations concernant les gènes d'*Arabidopsis* étudiés peuvent être trouvées sur la base de données *Arabidopsis* Genome Initiative. Les numéros d'accessions sont les suivants : *AGAMOUS* (AG, At4g18960); *KNUCKLES* (KNU, At5g14010); *Mini Zinc Finger2* (MIF2, At3g28917); *Mini Zinc Finger1* (MIF1, At1g74660); *Mini Zinc Finger3* (MIF3, At1g18835); *WUSCHEL* (WUS, At2g17950); *TOPLESS* (TPL, At1g15750), *Histone deacetylase 19* (HDA19, At4g38130); *ACTIN2* (ACT, At3g18780); *EF1 α* (EF1, At1g18070).

Les informations concernant les gènes étudiés chez la tomate peuvent être trouvées sur la base de donnée Sol Genomics Network (SGN, <http://solgenomics.net>; Fernandez-Pozo *et al.*, 2014). Les numéros d'accessions sont les suivants : *Tomato Agamous 1* (TAG1, Solyc02g071730), *SIKNUCKLES* (SIKNU), *SIWUSCHEL* (SIWUS, Solyc02g083950); *Inhibitor of Meristem Activity* (IMA, Solyc02g087970); *SITOPLESS-3* (SITPL3, Solyc01g100050), *SIHistone DeAcetylase3*, (SIHDA3, Solyc09g091440).

Bibliographie

- Abu-Romman S.** 2014. Molecular cloning and expression analysis of zinc finger-homeodomain transcription factor TaZFHD1 in wheat. *South African J Bot* **91**: 32–36.
- Aida M, Ishida T and Tasaka M.** 1999. Shoot apical meristem and cotyledon formation during Arabidopsis embryogenesis: interaction among the *CUP-SHAPED COTYLEDON* and *SHOOT MERISTEMLESS* genes. *Development* **126**: 1563–1570.
- Airoldi CA, Davies B.** 2012. Gene Duplication and the Evolution of Plant MADS-box Transcription Factors. *J Genet Genomics* **39**: 157–165.
- Airoldi C a, Bergonzi S, Davies B.** 2010. Single amino acid change alters the ability to specify male or female organ identity. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 18898–18902.
- Alexander L, Grierson D.** 2002. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *J Exp Bot* **53**: 2039–2055.
- Alvarez J, Smyth DR.** 1999. *CRABS CLAW* and *SPATULA*, two *Arabidopsis* genes that control carpel development in parallel with *AGAMOUS*. *Development* **126**: 2377–2386.
- Ampomah-Dwamena C.** 2002. Down-regulation of *TM29*, a tomato *SEPALLATA* homolog, causes parthenocarpic fruit development and floral reversion. *Plant Physiol* **130**: 605–617.
- Andrés F, Coupland G.** 2012. The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nat Rev Genet* **13**: 627–39.
- Angenent GC, Franken J, Busscher M, Weiss D, Vantunen AJ.** 1994. Co-suppression of the petunia homeotic gene *fbp2* affects the identity of the generative meristem. *Plant J* **5**: 33–44.
- Aukerman MJ, Lee I, Weigel D, Amasino RM.** 1999. The *Arabidopsis* flowering-time gene *LUMINIDEPENDENS* is expressed primarily in regions of cell proliferation and encodes a nuclear protein that regulates *LEAFY* expression. *Plant J* **18**: 195–203.
- Azzi L, Deluche C, Gévaudant F, Frangne N, Delmas F, Hernould M, Chevalier C.** 2015. Fruit growth-related genes in tomato. *J Exp Bot* **66**: 1075–7086.
- Balanzá V, Navarrete M, Trigueros M, Ferrándiz C.** 2006. Patterning the female side of *Arabidopsis*: the importance of hormones. *J Exp Bot* **57**: 3457–3469.

- Barth O, Vogt S, Uhlemann R, Zschiesche W, Humbeck K.** 2009. Stress induced and nuclear localized HIP26 from *Arabidopsis thaliana* interacts via its heavy metal associated domain with the drought stress related zinc finger transcription factor ATHB29. *Plant Mol Biol* **69**: 213–226.
- Barton MK.** 2010. Twenty years on: The inner workings of the shoot apical meristem, a developmental dynamo. *Dev Biol* **341**: 95–113.
- Barton MK, Poethig RS.** 1994. Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wild type and in the shoot meristemless mutant *Development* **119**: 823–831.
- Batley NH, Lyndon RF.** 1990. Reversion of flowering. *Bot Rev* **56**: 162–189.
- Belhaj K, Chaparro-Garcia A, Kamoun S, Nekrasov V.** 2013. Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods* **9**: 39.
- Bertrand C, Bergounioux C, Domenichini S, Delarue M, Zhou DX.** 2003. *Arabidopsis* histone acetyltransferase AtGCN5 regulates the floral meristem activity through the WUSCHEL/AGAMOUS pathway. *J Biol Chem* **278**: 28246–28251.
- Blazquez MA, Ferrandiz C, Madueno F, Parcy F.** 2006. How floral meristems are built. *Plant Mol Biol* **60**: 855–870.
- Blazquez MA.** 1998. Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the *LEAFY* promoter. *Plant Cell* **10**: 791–800.
- Boss PK.** 2004. Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting. *Plant Cell* **16**: S18–S31.
- Bourdon M, Coriton O, Pirrello J, Cheniclet C, Brown SC, Pujol C, Chevalier C, Renaudin JP, Frangne N.** 2011. *In planta* quantification of endoreduplication using fluorescent *in situ* hybridization (FISH). *Plant J* **66**: 1089–1099.
- Bowman JL, Smyth DR.** 1999. *CRABS CLAW*, a gene that regulates carpel and nectary development in *Arabidopsis*, encodes a novel protein with zinc finger and helix-loop-helix domains. *Development* **126**: 2387–2396.
- Bowman JL, Sakai H, Jack T, Weigel D, Mayer U, Meyerowitz EM.** 1992. *SUPERMAN*, a regulator of floral homeotic genes in *Arabidopsis*. **615**: 599–615.

- Brambilla V, Battaglia R, Colombo M, Masiero S, Bencivenga S, Kater MM, Colombo L.** 2007. Genetic and molecular interactions between BELL1 and MADS box factors support ovule development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 2544–2556.
- Brand U, Fletcher JC, Hobe M, Meyerowitz EM, Simon R.** 2000. Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science* **289**: 617–619.
- Brand U, Grünwald M, Hobe M, Simon R.** 2002. Regulation of CLV3 expression by two homeobox genes in *Arabidopsis*. *Plant physiology*. **129**: 565–575.
- Breuil-Broyer S, Trehin C, Morel P, Boltz V, Sun B, Chambrier P, Ito T, Negrutiu I.** 2016. Analysis of the *Arabidopsis* superman allelic series and the interactions with other genes demonstrate developmental robustness and joint specification of male–female boundary, flower meristem termination and carpel compartmentalization. *Ann Bot* **117**: 905–923.
- Brukhin V, Hernould M, Gonzalez N, Chevalier C, Mouras A.** 2003. Flower development schedule in tomato *Lycopersicon esculentum* cv *Sweet Cherry*. *Sex Plant Reprod* **15**: 311–320.
- Bueso E, Muñoz-Bertomeu J, Campos F, Brunaud V, Martínez L, Sayas E, Ballester P, Yenush L, Serrano R.** 2014. ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX25 Uncovers a Role for Gibberellins in Seed Longevity. *Plant Physiol* **164**: 999–1010.
- Bueso E, Muñoz-Bertomeu J, Campos F, Martínez C, Tello C, Martínez-Almonacid I, Ballester P, Simón-Moya M, Brunaud V, Yenush L, et al.** 2016. *Arabidopsis* COGWHEEL1 links light perception and gibberellins with seed tolerance to deterioration. *Plant J*.
- Busch W, Miotk A, Ariel FD, Zhao Z, Forner J, Daum G, Suzaki T, Schuster C, Schultheiss SJ, Leibfried A, et al.** 2010. Transcriptional control of a plant stem cell niche. *Dev Cell* **18**: 849–861.
- Bustos DM, Iglesias AA.** 2006. Intrinsic disorder is a key characteristic in partners that bind 14-3-3 proteins. *Proteins Struct Funct Genet* **63**: 35–42.
- Buvat R.** 1952. Structure, évolution et fonctionnement du méristème. *Ann Sci nat, Bot*, **13**: 199–300.
- Byrne ME, Barley R, Curtis M, Arroyo JM, Dunham M, Hudson A, Martienssen R A.** 2000. Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature* **408**: 967–971.

- Callebaut I, Labesse G, Durand P, Poupon A, Canard L, Chomilier J, Henrissat B, Mornon JP.** 1997. Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): Current status and perspectives. *Cell Mol Life Sci* **53**: 621–645.
- Carbonell-Bejerano P, Urbez C, Granell A, Carbonell J, Perez-Amador M a.** 2011. Ethylene is involved in pistil fate by modulating the onset of ovule senescence and the GA-mediated fruit set in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol* **11**: 84.
- Carles CC, Fletcher JC.** 2003. Shoot apical meristem maintenance: The art of a dynamic balance. *Trends Plant Sci* **8**: 394–401.
- Carles CC, Fletcher JC.** 2009. The SAND domain protein ULTRAPETALA1 acts as a trithorax group factor to regulate cell fate in plants. *Genes Dev* **23**: 2723–2728.
- Carles CC, Lertpiriyapong K, Reville K, Fletcher JC.** 2004. The *ULTRAPETALA1* gene functions early in *Arabidopsis* development to restrict shoot apical meristem activity and acts through *WUSCHEL* to regulate floral meristem determinacy. *Genetics* **167**: 1893–1903.
- Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M, Werner T.** 2005. MatInspector and beyond: Promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* **21**: 2933–2942.
- Cartolano M, Castillo R, Efremova N, Kuckenbergh M, Zethof J, Gerats T, Schwarz-Sommer Z, Vandenbussche M.** 2007. A conserved microRNA module exerts homeotic control over *Petunia hybrida* and *Antirrhinum majus* floral organ identity. *Nat Genet* **39**: 901–905.
- Causier B, Ashworth M, Guo W, Davies B.** 2012. The TOPLESS interactome: A Framework for Gene Repression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **158**: 423–438.
- Causier B, Castillo R, Zhou J, Ingram R, Xue Y, Schwarz-Sommer Z, Davies B.** 2005. Evolution in action: Following function in duplicated floral homeotic genes. *Curr Biol* **15**: 1508–1512.
- Causier B, Davies B.** 2014. Flower development in the asterid lineage. *Flower Dev Methods Protoc* 35–55.
- Causier B, Schwarz-Sommer Z, Davies B.** 2010. Floral organ identity: 20 years of ABCs. *Semin Cell Dev Biol* **21**: 73–79.
- Chanderbali AS, Yoo MJ, Zahn LM, Brockington SF, Wall PK, Gitzendanner MA, Albert VA, Leebens-Mack J, Altman NS, Ma H, et al.** 2010. Conservation and canalization of gene

- expression during angiosperm diversification accompany the origin and evolution of the flower. *Proc Natl Acad Sci* **107**: 22570–22575.
- Chandler JW**. 2012. Floral meristem initiation and emergence in plants. *Cell Mol Life Sci* **69**: 3807–3818.
- Chen X, Liu J, Cheng Y, Jia D**. 2002. *HEN1* functions pleiotropically in *Arabidopsis* development and acts in C function in the flower. *Development* **129**: 1085–1094.
- Chen X**. 2004. A MicroRNA as a Translational Repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis* Flower Development. *Science* **303**: 2022–2025.
- Chen Y, Cohen SM**. 2015. Investigating the Selectivity of Metalloenzyme Inhibitors in the Presence of Competing Metalloproteins. *ChemMedChem* **10**: 1733–1738.
- Cheng Y, Dai X, Zhao Y**. 2007. Auxin synthesized by the YUCCA flavin monooxygenases is essential for embryogenesis and leaf formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 2430–9.
- Cheng Y, Dai X, Zhao Y**. 2006. Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes Dev* **20**: 1790–1799.
- Cheng Y, Kato N, Wang W, Li J, Chen X**. 2003. Two RNA binding proteins, HEN4 and HUA1 act in the processing of AGAMOUS pre-mRNA in *Arabidopsis thaliana*. *Dev Cell* **4**: 53–66.
- Chickarmane VS, Gordon SP, Tarr PT, Heisler MG, Meyerowitz EM**. 2012. Cytokinin signaling as a positional cue for patterning the apical-basal axis of the growing *Arabidopsis* shoot meristem. *Proc Natl Acad Sci* **109**: 4002–7.
- Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH**. 1993. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* **365**: 855–859.
- Chuang CF, Running MP, Williams RW, Meyerowitz EM**. 1999. The *PERIANTHIA* gene encodes a bZIP protein involved in the determination of floral organ number in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* **13**: 334–344.
- Chung MY, Vrebalov J, Alba R, Lee J, McQuinn R, Chung JD, Klein P, Giovannoni J**. 2010. A tomato (*Solanum lycopersicum*) *APETALA2/ERF* gene, *SIAP2a*, is a negative regulator of fruit ripening. *Plant J* **64**: 936–947.

- Clark S, Running M, Meyerowitz E.** 1995. *CLAVATA3* is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as *CLAVATA1*. *Development* **121**: 2057–2067.
- Clough SJ, Bent AF.** 1998. Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735–743.
- Coen ES, Romero J, Doyle S, Elliott R, Murphy G, Carpenter R.** 1990. *Floricaula*: A homeotic gene required for flower development in *Antirrhinum majus*. *Cell* **63**: 1311–1322.
- Colombo M, Brambilla V, Marcheselli R, Caporali E, Kater MM, Colombo L.** 2010. A new role for the *SHATTERPROOF* genes during *Arabidopsis* gynoecium development. *Dev Biol* **337**: 294–302.
- Cong B, Tanksley SD.** 2006. *FW2.2* and cell cycle control in developing tomato fruit: A possible example of gene co-option in the evolution of a novel organ. *Plant Mol Biol* **62**: 867–880.
- Cortina C, Culiáñez-Macià FA.** 2004. Tomato transformation and transgenic plant production. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **76**: 269–275.
- Crane BJC.** 1963. Growth Substances in Fruit Setting. *Annu Rev Plant Physiol*.
- Czerednik A, Busscher M, Bielen BAM, Wolters-Arts M, De Maagd RA, Angenent GC.** 2012. Regulation of tomato fruit pericarp development by an interplay between *CDKB* and *CDKA1* cell cycle genes. *J Exp Bot* **63**: 2605–2617.
- Dathan N, Zaccaro L, Esposito S, Isernia C, Omichinski JG, Riccio A, Pedone C, Di Blasio B, Fattorusso R, Pedone P V.** 2002. The *Arabidopsis* SUPERMAN protein is able to specifically bind DNA through its single Cys2-His2 zinc finger motif. *Nucleic Acids Res* **30**: 4945–4951.
- De Jong M, Mariani C, Vriezen WH.** 2009. The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set. *J Exp Bot* **60**: 1523–1532.
- De Jong M, Wolters-Arts M, Garcia-Martinez JL, Mariani C, Vriezen WH.** 2011. The *Solanum lycopersicum* AUXIN RESPONSE FACTOR 7 (SIARF7) mediates cross-talk between auxin and gibberellin signalling during tomato fruit set and development. *J Exp Bot* **62**: 617–626.
- Ding J, Chen B, Xia X, Mao W, Shi K, Zhou Y, Yu J.** 2013. Cytokinin-Induced Parthenocarpic Fruit Development in Tomato Is Partly Dependent on Enhanced Gibberellin and Auxin Biosynthesis. *PLoS One* **8**: 1–11.

- Dinneny JR, Weigel D, Yanofsky MF.** 2006. *NUBBIN* and *JAGGED* define stamen and carpel shape in *Arabidopsis*. *Development* **133**: 1645–1655.
- Ditta G, Pinyopich A, Robles P, Pelaz S, Yanofsky MF.** 2004. The *SEP4* gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity. *Curr Biol* **14**: 1935–1940.
- Drews GN, Bowman JL, Meyerowitz EM.** 1991. Negative regulation of the *Arabidopsis* homeotic gene *AGAMOUS* by the *APETALA2* product. *Cell* **65**: 991–1002.
- Durek P, Schmidt R, Heazlewood JL, Jones A, MacLean D, Nagel A, Kersten B, Schulze WX.** 2009. PhosPhAt: The *Arabidopsis thaliana* phosphorylation site database. An update. *Nucleic Acids Res* **38**: 828–834.
- Dyson HJ, Wright PE.** 2005. Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 197–208.
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C.** 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* **19**: 1349.
- Eguen T, Straub D, Graeff M, Wenkel S.** 2015. MicroProteins: small size - big impact. *Trends Plant Sci* **20**: 477–82.
- Ehsan H, Reichheld J, Durfee T, Roe JL, Kansas HE, Ge L.** 2004. TOUSLED Kinase Activity Oscillates during the Cell Cycle and Interacts with Chromatin Regulators. *Plant Physiology* **134**: 1488–1499.
- Elliott RC.** 1996. *AINTEGUMENTA*, an *APETALA2*-like Gene of *Arabidopsis* with Pleiotropic Roles in Ovule Development and Floral Organ Growth. *Plant Cell* **8**: 155–168.
- Engelhorn J, Blanvillain R, Carles CC.** 2014. Gene activation and cell fate control in plants: A chromatin perspective. *Cell Mol Life Sci* **71**: 3119–3137.
- Esau K.** 1965. Anatomy of seed plants. *New york John Wiley Sons*.
- Eshed Y, Baum SF, Bowman JL.** 1999. Distinct mechanisms promote polarity establishment in carpels of *Arabidopsis*. *Cell* **99**: 199–209.
- Favaro R, Pinyopich A, Battaglia R, Kooiker M, Borghi L, Ditta G, Yanofsky M, Kater M, Colombo L.** 2003. MADS-Box Protein Complexes Control Carpel and Ovule Development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**: 2603–2611.
- Fernández-Lozano A, Yuste-Lisbona FJ, Pérez-Martín F, Pineda B, Moreno V, Lozano R, Angosto T.** 2015. Mutation at the tomato *EXCESSIVE NUMBER OF FLORAL ORGANS*

- (*ENO*) locus impairs floral meristem development, thus promoting an increased number of floral organs and fruit size. *Plant Sci* **232**: 41–48.
- Fernandez-Pozo N, Menda N, Edwards JD, Saha S, Tecle IY, Strickler SR, Bombarely A, Fisher-York T, Pujar A, Foerster H, et al.** 2015. The Sol Genomics Network (SGN)-from genotype to phenotype to breeding. *Nucleic Acids Res* **43**: D1036–D1041.
- Ferrario S, Immink RGH, Angenent GC.** 2004. Conservation and diversity in flower land. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 84–91.
- Ferrario S, Immink RGH, Shchennikova A, Busscher-Lange J, Angenent GC.** 2003. The MADS Box Gene *FBP2* Is Required for *SEPALLATA* Function in Petunia. *Plant Cell* **15**: 914–925.
- Ferrario S, Shchennikova A V, Franken J, Immink RGH, Angenent GC.** 2006. Control of floral meristem determinacy in petunia by MADS-box transcription factors. *Plant Physiol* **140**: 890–898.
- Flanagan CA, Hu Y, Ma H.** 1996. Specific expression of the *AGL1* MADS-box gene suggests regulatory functions in Arabidopsis gynoecium and ovule development. *Plant J* **10**: 343–353.
- Fletcher JC.** 2001. The *ULTRAPETALA* gene controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Development* **128**: 1323–1333.
- Fujita H, Toyokura K, Okada K, Kawaguchi M.** 2011. Reaction-diffusion pattern in shoot apical meristem of plants. *PLoS One* **6**.
- Gasser CS, Robinson-beers K.** 1993. Pistil Development. *Plant Cell* **5**: 1231–1239.
- Geuten K, Irish V.** 2010. Hidden variability of floral homeotic B genes in *Solanaceae* provides a molecular basis for the evolution of novel functions. *Plant Cell* **22**: 2562–2578.
- Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W.** 1993. Fruits: A Developmental Perspective. *Plant Cell* **5**: 1439–1451.
- Goethe JW von.** 1790. Versuch die Metamorphose der Pflanzen zu erklären.
- Gómez-Mena C, de Folter S, Costa MMR, Angenent GC, Sablowski R.** 2005. Transcriptional program controlled by the floral homeotic gene *AGAMOUS* during early organogenesis. *Development* **132**: 429–38.
- Graeff M, Straub D, Eguen T, Dolde U, Rodrigues V, Brandt R, Wenkel S.** 2016. MicroProtein-Mediated Recruitment of CONSTANS into a TOPLESS Trimeric Complex Represses Flowering in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* **12**: e1005959.

- Graham B. Seymour, Lars Østergaard, Natalie H. Chapman SK, Cathie Martin.** 2013. Fruit Development and Ripening. *Annu Rev Plant Biol* **64**: 219–41.
- Grandillo S, Ku HM, Tanksley SD.** 1999. Identifying the loci responsible for natural variation in fruit size and shape in tomato. *Theor Appl Genet* **99**: 978–987.
- Green KA, Prigge MJ, Katzman RB, Clark SE.** 2005. CORONA, a member of the class III homeodomain leucine zipper gene family in *Arabidopsis*, regulates stem cell specification and organogenesis. *Plant Cell* **17**: 691–704.
- Gregis V, Sessa A, Colombo L, Kater M.** 2008. AGAMOUS-LIKE24 and SHORT VEGETATIVE PHASE determine floral meristem identity in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **56**: 891–902
- Grew NMD.** 1672. The anatomy of vegetables begun. With a general account of vegetation founded thereon. *London Royal society*.
- Grigorova B, Mara C, Hollender C, Sijacic P, Chen X, Liu Z.** 2011. LEUNIG and SEUSS co-repressors regulate miR172 expression in *Arabidopsis* flowers. *Development* **138**: 2451–2456.
- Grones P, Chen X, Simon S, Kaufmann WA, De Rycke R, Nodzynski T, Zazimalova E, Friml J.** 2015. Auxin-binding pocket of ABP1 is crucial for its gain-of-function cellular and developmental roles. *J Exp Bot* **66**: 5055–5065.
- Gross-Hardt R, Laux T.** 2003. Stem cell regulation in the shoot meristem. *J Cell Sci* **116**: 1659–1666.
- Gu Q, Ferrándiz C, Yanofsky MF, Martienssen R.** 1998. The FRUIFULL MADS-box gene mediate cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development. *Development* **125**: 1509–1517.
- Guilfoyle TJ, Hagen G.** 2007. Auxin response factors. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 453–460.
- Gunter Theisen and Heinz Saedler.** 2014. Floral quartet. *Nature* **409**: 469–471.
- Hardtke CS, Berleth T.** 1998. The *Arabidopsis* gene MONOPTEROS encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO J* **17**: 1405–1411.
- Hay A, Barkoulas M, Tsiantis M.** 2006. ASYMMETRIC LEAVES1 and auxin activities converge to repress BREVIPEDICELLUS expression and promote leaf development in *Arabidopsis*. *Development* **133**: 3955–3961.

- Hay A, Kaur H, Phillips A, Hedden P, Hake S, Tsiantis M.** 2002. The gibberellin pathway mediates KNOTTED1-type homeobox function in plants with different body plans. *Curr Biol* **12**: 1557–1565.
- Heijmans K, Ament K, Rijpkema AS, Zethof J, Wolters-Arts M, Gerats T, Vandenbussche M.** 2012. Redefining C and D in the petunia ABC. *Plant Cell* **24**: 2305–17.
- Heisler MG, Atkinson a, Bylstra YH, Walsh R, Smyth DR.** 2001. *SPATULA*, a gene that controls development of carpel margin tissues in *Arabidopsis*, encodes a bHLH protein. *Development* **128**: 1089–1098.
- Heisler MG, Ohno C, Das P, Sieber P, Reddy G V., Long JA, Meyerowitz EM.** 2005. Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem. *Curr Biol* **15**: 1899–1911.
- Hong SY, Kim OK, Kim SG, Yang MS, Park CM.** 2011. Nuclear import and DNA binding of the ZHD5 transcription factor is modulated by a competitive peptide inhibitor in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **286**: 1659–1668.
- Honma T, Goto K.** 2000. The *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA* is regulated by discrete cis-elements responsive to induction and maintenance signals. *Development* **127**: 2021–2030.
- Honma T, Goto K.** 2001. Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* **409**: 525–529.
- Hu W, Depamphilis CW, Ma H.** 2008. Phylogenetic analysis of the plant-specific zinc finger-homeobox and mini zinc finger gene families. *J Integr Plant Biol* **50**: 1031–1045.
- Hu W, Feng B, Ma H.** 2011. Ectopic expression of the *Arabidopsis* *MINI ZINC FINGER1* and *MIF3* genes induces shoot meristems on leaf margins. *Plant Mol Biol* **76**: 57–68.
- Hu W, Ma H.** 2006. Characterization of a novel putative zinc finger gene *MIF1*: Involvement in multiple hormonal regulation of *Arabidopsis* development. *Plant J* **45**: 399–422.
- Huang H, Mizukami Y, Hu Y, Ma H.** 1993. Isolation and characterization of the binding sequences for the product of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *AGAMOUS*. *Nucleic Acids Res* **21**: 4769–4776.
- Huang H, Tudor M, Weiss CA, Hu Y, Ma H.** 1995. The *Arabidopsis* MADS-box gene *AGL3* is widely expressed and encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *Plant Mol Biol* **28**: 549–567.

- Huang S, Cerny RE, Qi Y, Bhat D, Aydt CM, Hanson DD, Malloy KP, Ness LA.** 2003. Transgenic Studies on the Involvement of Cytokinin and Gibberellin in Male Development. *Plant Physiology*. **131**: 1270–1282.
- Huang Z, Shi T, Zheng B, Yumul RE, Liu X, You C, Xiao L, Chen X.** 2016. *APETALA2* antagonizes the transcriptional activity of *AGAMOUS* in regulating floral stem cells in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*. **10**:1111
- Huijser P, Klein J, Lönnig WE, Meijer H, Saedler H, Sommer H.** 1992. *Bracteomania*, an inflorescence anomaly, is caused by the loss of function of the MADS-box gene *SQUAMOSA* in *Antirrhinum majus*. *EMBO J* **11**: 1239–1249.
- Hunter T.** 2007. The Age of Crosstalk: Phosphorylation, Ubiquitination, and Beyond. *Mol Cell* **28**: 730–738.
- Iakoucheva LM, Radivojac P, Brown CJ, O'Connor TR, Sikes JG, Obradovic Z, Dunker AK.** 2004. The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. *Nucleic Acids Res* **32**: 1037–1049.
- Immink RGH, Ferrario S, Busscher-Lange J, Kooiker M, Busscher M, Angenent GC.** 2003. Analysis of the petunia MADS-box transcription factor family. *Mol Genet Genomics* **268**: 1037–1049.
- Immink RG, Hannapel DJ, Ferrario S, Busscher M, Franken J, Lookeren Campagne MM, Angenent GC.** 1999. A petunia MADS box gene involved in the transition from vegetative to reproductive development. *Development* **126**: 5117–5126.
- Isernia C, Bucci E, Leone M, Zaccaro L, Di Lello P, Digilio G, Esposito S, Saviano M, Di Blasio B, Pedone C, et al.** 2003. NMR structure of the single QALGGH zinc finger domain from the *Arabidopsis thaliana* SUPERMAN protein. *Chembiochem* **4**: 171–180.
- Ishida T, Tabata R, Yamada M, Aida M, Mitsumasu K, Fujiwara M, Yamaguchi K, Shigenobu S, Higuchi M, Tsuji H, et al.** 2014. Heterotrimeric G proteins control stem cell proliferation through *CLAVATA* signaling in *Arabidopsis*. *EMBO Rep* **15**: 1202–9.
- Ito T, Wellmer F, Yu H, Das P, Ito N, Alves-Ferreira M, Riechmann JL, Meyerowitz EM.** 2004. The homeotic protein *AGAMOUS* controls microsporogenesis by regulation of *SPOROCTELESS*. *Nature* **430**: 356–360.
- Jasinski S, Piazza P, Craft J, Hay A, Woolley L, Rieu I, Phillips A, Hedden P, Tsiantis M.** 2005. *KNOX* action in *Arabidopsis* is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. *Curr Biol* **15**: 1560–1565.

- Ji L, Liu X, Yan J, Wang W, Yumul RE, Kim YJ, Dinh TT, Liu J, Cui X, Zheng B, et al.** 2011. *ARGONAUTE10* and *ARGONAUTE1* regulate the termination of floral stem cells through two microRNAs in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* **7**: 1–14.
- Jofuku KD.** 1994. Control of *Arabidopsis* Flower and Seed Development by the Homeotic Gene *APETALA2*. *Plant Cell* **6**: 1211–1225.
- Johnston JA, Ward CL, Kopito RR.** 1998. Aggresomes: A cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* **143**: 1883–1898.
- Joubès J, Chevalier C.** 2000. Endoreduplication in higher plants. *Plant Mol Biol* **43**: 735–745.
- Jung JH, Seo PJ, Kang SK, Park CM.** 2011. miR172 signals are incorporated into the miR156 signaling pathway at the *SPL3/4/5* genes in *Arabidopsis* developmental transitions. *Plant Mol Biol* **76**: 35–45.
- Kagale S, Links MG, Rozwadowski K.** 2010. Genome-Wide Analysis of Ethylene-Responsive Element Binding Factor-Associated Amphiphilic Repression Motif-Containing Transcriptional Regulators in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **152**: 1109–1134.
- Kagale S, Rozwadowski K.** 2011. EAR motif-mediated transcriptional repression in plants: An underlying mechanism for epigenetic regulation of gene expression. *Epigenetics* **6**: 141–146.
- Kapoor M, Tsuda S, Tanaka Y, Mayama T, Okuyama Y, Tsuchimoto S, Takatsuji H.** 2002. Role of petunia pMADS3 in determination of floral organ and meristem identity, as revealed by its loss of function. *Plant J* **32**: 115–127.
- Karim MR, Hirota A, Kwiatkowska D, Tasaka M, Aida M.** 2009. A role for *Arabidopsis PUCHI* in floral meristem identity and bract suppression. *Plant Cell* **21**: 1360–1372.
- Karlova R, Rosin MF, Busscher-Lange J, Parapunova V, Do PT, Fernie AR, Fraser PD, Baxter C, Angenent GC, de Maagd R a.** 2011. Transcriptome and metabolite profiling show that *APETALA2a* is a major regulator of tomato fruit ripening. *Plant Cell* **23**: 923–941.
- Kater MM.** 1998. Multiple *AGAMOUS* Homologs from Cucumber and Petunia Differ in Their Ability to Induce Reproductive Organ Fate. *Plant Cell Online* **10**: 171–182.

- Kaufmann K, Muino JM, Jauregui R, Airoidi CA, Smaczniak C, Krajewski P, Angenent GC.** 2009. Target genes of the MADS transcription factor SEPALLATA3: Integration of developmental and hormonal pathways in the *Arabidopsis* flower. *PLoS Biol* **7**: 854–875.
- Kaufmann K, Wellmer F, Muiño JM, Ferrier T, Wuest SE, Kumar V, Serrano-Mislata A, Madueño F, Krajewski P, Meyerowitz EM, et al.** 2010. Orchestration of floral initiation by *APETALA1*. *Science* **328**: 85–9.
- Kawaguchi Y, Kovacs JJ, McLaurin A, Vance JM, Ito A, Yao TP.** 2003. The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell* **115**: 727–738.
- Keck E, McSteen P, Carpenter R, Coen E.** 2003. Separation of genetic functions controlling organ identity in flowers. *EMBO J* **22**: 1058–1066.
- Kerstetter R a, Bollman K, Taylor R a, Bomblies K, Poethig RS.** 2001. *KANADI* regulates organ polarity in *Arabidopsis*. *Nature* **411**: 706–709.
- Kieffer M, Stern Y, Cook H, Clerici E, Maulbetsch C, Laux T, Davies B.** 2006. Analysis of the transcription factor WUSCHEL and its functional homologue in *Antirrhinum* reveals a potential mechanism for their roles in meristem maintenance. *Plant Cell* **18**: 560–573.
- Kim YC, Nakajima M, Nakayama A, Yamaguchi I.** 2005. Contribution of gibberellins to the formation of *Arabidopsis* seed coat through starch degradation. *Plant Cell Physiol* **46**: 1317–1325.
- Klepikova A V., Logacheva MD, Dmitriev SE, Penin A** 2015. RNA-seq analysis of an apical meristem time series reveals a critical point in *Arabidopsis thaliana* flower initiation. *BMC Genomics* **16**: 466
- Klutcher K, Chow H, Reiser L, Fischer RL.** 1996. The *AINTEGUMENTA* Gene of *Arabidopsis* Required for Ovule and Female Gametophyte Development Is Related to the Floral Homeotic Gene *APETALA2*. *Plant Cell* **8**: 137–153.
- Koncz C, Schell J.** 1986. The promoter of T_L-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *MGG Mol Gen Genet* **204**: 383–396.
- Koornneef M, van der Veen JH.** 1980. Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) heyneh. *Theor Appl Genet* **58**: 257–263.

- Koornneef M, Alonso-Blanco C, Vreugdenhil D, Vaughn MW, Tanurdžić M, Lippman Z, Jiang H, Carrasquillo R, Rabinowicz PD, Dedhia N, et al.** 2005. Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proc Natl Acad Sci* **102**: 3123–3128.
- Křeček P, Skůpa P, Libus J, Naramoto S, Tejos R, Friml J, Zažímalová E.** 2009. The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biol* **10**: 249.
- Krogan NT, Hogan K, Long JA.** 2012. APETALA2 negatively regulates multiple floral organ identity genes in *Arabidopsis* by recruiting the co-repressor TOPLESS and the histone deacetylase HDA19. **4190**: 4180–4190.
- Kuusk S, Lagercrantz U, Kowalczyk M, Sohlberg JJ, Myrena M.** 2006. *STY1* regulates auxin homeostasis and affects apical–basal patterning of the *Arabidopsis* gynoecium. *Plant J* **47**: 112–123.
- Lafarga M, Berciano MT, Pena E, Mayo I, Castan G, Bohmann D, Rodrigues P, Tavanez P.** 2002. Clastosome : A Subtype of Nuclear Body Enriched in 19S and 20S Proteasomes, Ubiquitin, and Protein Substrates of Proteasome. **13**: 2771–2782.
- Laux T, Mayer KF, Berger J, Jürgens G.** 1996. The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development* **122**: 87–96.
- Lee J, Baum SF, Oh S, Jiang C, Chen J, Bowman JL.** 2005. Recruitment of *CRABS CLAW* to promote nectary development within the eudicot clade. *Development* **132**: 5021–5032.
- Lee J, Oh M, Park H, Lee I.** 2008. SOC1 translocated to the nucleus by interaction with AGL24 directly regulates *LEAFY*. *Plant J* **55**: 832–843.
- Leibfried A, To JPC, Busch W, Stehling S, Kehle A, Demar M, Kieber JJ, Lohmann JU.** 2005. *WUSCHEL* controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature* **438**: 1172–5.
- Lenhard M, Bohnert A, Jürgens G, Laux T.** 2001. Termination of stem cell maintenance in *Arabidopsis* floral meristems by interactions between *WUSCHEL* and *AGAMOUS*. *Cell* **105**: 805–814.
- Lenhard M, Laux T.** 2003. Stem cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot meristem is regulated by intercellular movement of *CLAVATA3* and its sequestration by *CLAVATA1*. *Development* **130**: 3163–3173.

- Lepiniec L, Debeaujon I, Routaboul J-M, Baudry A, Pourcel L, Nesi N, Caboche M.** 2006. Genetics and Biochemistry of Seed Flavonoids. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 405–430.
- Lieutaud P, Canard B, Longhi S.** 2008. MeDor: a metaserver for predicting protein disorder. *BMC Genomics*. **5**: 1–5.
- Liljgren SJ, Ditta GS, Eshed Y, Savidge B, Bowman JL, Yanofsky MF.** 2000. SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in Arabidopsis. *Nature* **404**: 766–770.
- Lin W, Shuai B, Springer PS.** 2003. The Arabidopsis LATERAL ORGAN BOUNDARIES-Domain Gene ASYMMETRIC LEAVES2 Functions in the Repression of KNOX Gene Expression and in Adaxial-Abaxial Patterning. *Plant Cell* **15**: 2241–2252.
- Liscum E, Reed JW.** 2002. Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol Biol* **49**: 387–400.
- Liu C, Xi W, Shen L, Tan C, Yu H.** 2009. Regulation of Floral Patterning by Flowering Time Genes. *Dev Cell* **16**: 711–722.
- Liu D, Wang D, Qin Z, Zhang D, Yin L, Wu L, Colasanti J, Li A, Mao L.** 2014. The SEPALLATA MADS-box protein SLMBP21 forms protein complexes with JOINTLESS and MACROCALYX as a transcription activator for development of the tomato flower abscission zone. *Plant J* **77**: 284–296.
- Liu X, Kim Y, Müller R, Yumul R.** 2011. AGAMOUS terminates floral stem cell maintenance in Arabidopsis by directly repressing WUSCHEL through recruitment of Polycomb group proteins. *Plant Cell* **23**: 3654–3670.
- Liu Z, Franks RG, Klink VP.** 2000. Regulation of gynoecium marginal tissue formation by LEUNIG and AINTEGUMENTA. *Plant Cell* **12**: 1879–1892.
- Liu Z, Meyerowitz EM.** 1995. LEUNIG regulates AGAMOUS expression in Arabidopsis flowers. *Development* **121**: 975–991.
- Llorente F, Alonso-Blanco C, Sánchez-Rodríguez C, Jorda L, Molina A.** 2005. ERECTA receptor-like kinase and heterotrimeric G protein from Arabidopsis are required for resistance to the necrotrophic fungus Plectosphaerella cucumerina. *Plant J* **43**: 165–180.
- Lohmann JU, Hong RL, Hobe M, Busch M a, Parcy F, Simon R, Weigel D.** 2001. A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in Arabidopsis. *Cell* **105**: 793–803.

- Long J a, Moan EI, Medford JI, Barton MK.** 1996. A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* **379**: 66–69.
- Long J, Barton MK.** 2000. Initiation of axillary and floral meristems in *Arabidopsis*. *Dev Biol* **218**: 341–353.
- Kieffer M, Stern Y, Cook H, Clerici E, Maulbetsch C, Laux T, Davies B.** 2006. Analysis of the transcription factor WUSCHEL and its functional homologue in *Antirrhinum* reveals a potential mechanism for their roles in meristem maintenance. *Plant Cell* **18**: 560–573.
- Loots GG, Ovcharenko I.** 2004. rVISTA 2.0: Evolutionary analysis of transcription factor binding sites. *Nucleic Acids Res* **32**: 217–221.
- Ma H, Yanofsky MF, Meyerowitz EM.** 1991. *AGL1-AGL6*, an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes. *Genes Dev* **5**: 484–495.
- Maes T.** 2001. Petunia *AP2-like* Genes and Their Role in Flower and Seed Development. *Plant Cell* **13**: 229–244.
- Maes T, de Steene N, Gerats T, Van Montagu M.** 1998. The *AP2-like* genes of *Petunia hybrida*. *Flower Newsletter* 35–40.
- Maier AT, Stehling-Sun S, Wollmann H, Demar M, Hong RL, Haubeiss S, Weigel D, Lohmann JU.** 2009. Dual roles of the bZIP transcription factor PERIANTHIA in the control of floral architecture and homeotic gene expression. *Development* **136**: 1613–20.
- Mao L, Begum D, Chuang HW, Budiman M a, Szymkowiak EJ, Irish EE, Wing R** 2000. JOINTLESS is a MADS-box gene controlling tomato flower abscission zone development. *Nature* **406**: 910–913.
- Maoiléidigh DSÓ, Wuest SE, Rae L, Raganelli A, Ryan PT, Das P, Lohan AJ, Loftus B, Graciet E, Kwa K.** 2013. Control of Reproductive Floral Organ Identity Specification in *Arabidopsis* by the C Function Regulator *AGAMOUS*. *Plant Cell* **25**: 2482–2503.
- Martino G De, Pan I, Emmanuel E, Levy A, Irish VF, de Martino G, Pan I, Emmanuel E, Levy A, Irish VF.** 2006. Functional analyses of two tomato *APETALA3* genes demonstrate diversification in their roles in regulating floral development. *Plant Cell* **18**: 1833–1845.
- Matsuoka K, Furukawa J, Bidadi H, Asahina M, Yamaguchi S, Satoh S.** 2014. Gibberellin-induced expression of Fe uptake-related genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **55**: 87–98.

- Mayer KF, Schoof H, Haecker A, Lenhard M, Jürgens G, Laux T.** 1998. Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* **95**: 805–15.
- Medford JI.** 1992. Normal and Abnormal Development in the *Arabidopsis* Vegetative Shoot Apex. *Plant Cell* **4**: 631–643.
- Medford J.** 1992. Vegetative Apical Meristems. *Plant Cell* **4**: 1029–1039.
- Meyerowitz EM.** 1987. *In situ* hybridization to RNA in plant tissue. *Plant Mol Biol Report* **5**: 242–250.
- Mizukami Y, Ma H.** 1992. Ectopic expression of the floral homeotic gene *AGAMOUS* in transgenic *Arabidopsis* plants alters floral organ identity. *Cell* **71**: 119–131.
- Mizzotti C, Ezquer I, Paolo D, Rueda-romero P, Fiorella R, Battaglia R, Rogachev I, Aharoni A, Kater MM.** 2014. *SEEDSTICK* is a Master Regulator of Development and Metabolism in the *Arabidopsis* Seed Coat. *Plos Genetics*. **10**.
- Molinero-Rosales N, Latorre A, Jamilena M, Lozano R.** 2004. *Single Flower Truss* regulates the transition and maintenance of flowering in tomato. *Planta* **218**: 427–434.
- Mounet F, Moing A, Kowalczyk M, Rohrmann J, Petit J, Garcia V, Maucourt M, Yano K, Deborde C, Aoki K, et al.** 2012. Down-regulation of a single auxin efflux transport protein in tomato induces precocious fruit development. *J Exp Bot* **13**:4901-4917.
- Mudunkothge JS, Krizek BA.** 2014. The GUS reporter system in flower development studies. *Flower Dev Methods Protoc* 295–304.
- Muños S, Ranc N, Botton E, Bérard A, Rolland S, Duffé P, Carretero Y, Paslier M-C Le, Delalande C, Bouzayen M, et al.** 2011. Increase in Tomato Locule Number Is Controlled by Two Single-Nucleotide Polymorphisms Located Near *WUSCHEL*. *Plant Physiol* **156**: 2244–2254.
- Murashige T und Skoog F.** 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* **15**: 473–497.
- Nakajima Y, Suzuki S.** 2013. Environmental Stresses Induce Misfolded Protein Aggregation in Plant Cells in a Microtubule-Dependent Manner. *Int. J. Mol. Sci.* **14**:7771–7783.
- Nemhauser JL, Feldman LJ, Zambryski PC.** 2000. Auxin and *ETTIN* in *Arabidopsis* gynoecium morphogenesis. *Development* **127**: 3877–3888.
- Ng CK-Y, Kinoshita T, Pandey S, Shimazaki K, Assmann SM.** 2004. Abscisic Acid Induces Rapid Subnuclear Reorganization in Guard Cells. *Plant Physiol* **134**: 1327–1331.

- Nitsch JP.** 1952. Plant hormones in the development of fruits. *Q Rev Biol* **27**: 33–57.
- Nietzsche M, Landgraf R, Tohge T, Börnke F.** 2016. A protein–protein interaction network linking the energy-sensor kinase SnRK1 to multiple signaling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Plant Biol* **5**: 36–44.
- Ogawa T, Uchimiya H, Kawai-Yamada M.** 2007. Mutual regulation of *Arabidopsis thaliana* ethylene-responsive element binding protein and a plant floral homeotic gene, *APETALA2*. *Ann Bot* **99**: 239–244.
- Ogawa M, Shinohara H, Sakagami Y, Matsubayashi Y.** 2008. *Arabidopsis* CLV3 Peptide Directly Binds CLV1 Ectodomain. *Science* **319**: 294–294.
- Ohto M aki, Floyd SK, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ.** 2009. Effects of *APETALA2* on embryo, endosperm, and seed coat development determine seed size in *Arabidopsis*. *Sex Plant Reprod* **22**: 277–289.
- Okada K, Ueda J, Komaki MK, Bell CJ, Shimura Y.** 1991. Requirement of the Auxin Polar Transport System in Early Stages of *Arabidopsis* Floral Bud Formation. *Plant Cell* **3**: 677–684.
- Okamoto JK, den Boer BG, Lotys-Prass C, Szeto W, Jofuku KD.** 1996. Flowers into shoots: photo and hormonal control of a meristem identity switch in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci* **93**: 13831–13836.
- Ossowski S, Schwab R, Weigel D.** 2008. Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. *Plant J* **53**: 674–90.
- Pajoro A, Madrigal P, Muiño JM, Matus JT, Jin J, Mecchia M a, Debernardi JM, Palatnik JF, Balazadeh S, Arif M, et al.** 2014. Dynamics of chromatin accessibility and gene regulation by MADS-domain transcription factors in flower development. *Genome Biol* **15**: R41.
- Park HC, Kim ML, Lee SM, Bahk JD, Yun D-J, Lim CO, Hong JC, Lee SY, Cho MJ, Chung WS.** 2007. Pathogen-induced binding of the soybean zinc finger homeodomain proteins GmZF-HD1 and GmZF-HD2 to two repeats of ATTA homeodomain binding site in the *calmodulin isoform 4 (GmCaM4)* promoter. *Nucleic Acids Res* **35**: 3612–23.
- Paserang AP, Tjahjoleksono A, Widyastuti U, Suharsono S.** 2015. Transformation of *Inhibitor of Meristem Activity (IMA)* Gene into *Jatropha curcas* L. *Makara J Sci* **19**: 117–122.

- Patron N, et al.** 2015. Standards for Plant Synthetic Biology: A Common Syntax for Exchange of DNA Parts. *New Phytol* 13–19.
- Payne T, Johnson SD, Koltunow AM.** 2004. *KNUCKLES (KNU)* encodes a C2H2 zinc-finger protein that regulates development of basal pattern elements of the *Arabidopsis* gynoecium. *Development* **131**: 3737–49.
- Pelaz S, Ditta GS, Yanofsky MF.** 2000. B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature* **405**: 9–12.
- Pelaz S, Tapia-Lopez R, Alvarez-Buylla ER, Yanofsky MF.** 2001. Conversion of leaves into petals in *Arabidopsis*. *Curr Biol* **11**: 182–184.
- Petrasek J, Friml J.** 2009. Auxin transport routes in plant development. *Development* **136**: 2675–2688.
- Pinyopich A, Ditta G, Savidge B.** 2003. Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature*.
- Pnueli L, Carmel-Goren L, Hareven D, Gutfinger T, Alvarez J, Ganai M, Zamir D, Lifschitz E.** 1998. The *SELF-PRUNING* gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of *CEN* and *TFL1*. *Development* **125**: 1979–1989.
- Pnueli L, Hareven D, Rounsley SD, Yanofsky MF, Lifschitz E.** 1994. Isolation of the tomato *AGAMOUS* gene *TAG1* and analysis of its homeotic role in transgenic plants. *Plant Cell* **6**: 163–173.
- Potten CS, Loeffler M.** 1990. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* **110**: 1001–1020.
- Pouteau S, Nicholls D, Tooke F, Coen E, Battey N.** 1997. The induction and maintenance of flowering in *Impatiens*. *Development* **124**: 3343–51.
- Prigge MJ, Otsuga D, Alonso JM, Ecker JR, Drews GN, Clark SE.** 2005. Class III homeodomain-leucine zipper gene family members have overlapping, antagonistic, and distinct roles in *Arabidopsis* development. *The Plant Cell* **17**: 61–76.
- Prunet N, Jack TP.** 2014. Flower Development in *Arabidopsis*: There Is More to It Than Learning Your ABCs. *Methods in Molecular Biology* **1110**
- Prunet N, Morel P, Negrutiu I, Trehin C.** 2009. Time to stop: flower meristem termination. *Plant Physiol* **150**: 1764–72.

- Prunet N, Morel P, Thierry A-M, Eshed Y, Bowman JL, Negrutiu I, Trehin C.** 2008. *REBELOTE*, *SQUINT*, and *ULTRAPETALA1* function redundantly in the temporal regulation of floral meristem termination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **20**: 901–919.
- Putterill J, Laurie R, Macknight R.** 2004. It's time to flower: The genetic control of flowering time. *BioEssays* **26**: 363–373.
- Reddy GV, Heisler MG, Ehrhardt DW, Meyerowitz EM.** 2004. Real-time lineage analysis reveals oriented cell divisions associated with morphogenesis at the shoot apex of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **131**: 4225–4237.
- Reinhardt D.** 2000. Auxin Regulates the Initiation and Radial Position of Plant Lateral Organs. *Plant Cell* **12**: 507–518.
- Reinhardt D, Frenz M, Mandel T, Kuhlemeier C.** 2003. Microsurgical and laser ablation analysis of interactions between the zones and layers of the tomato shoot apical meristem. *Development* **130**: 4073–4083.
- Richards DE, King KE, Ait-ali T, Harberd NP.** 2001. HOW GIBBERELLIN REGULATES PLANT GROWTH AND DEVELOPMENT: A Molecular Genetic Analysis of Gibberellin Signaling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 67–88.
- Riechmann JL, Wang M, Meyerowitz EM.** 1996. DNA-binding properties of Arabidopsis MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA and AGAMOUS. *Nucleic Acids Res* **24**: 3134–41.
- Rijkema AS, Vandenbussche M, Koes R, Heijmans K, Gerats T.** 2010. Variations on a theme: Changes in the floral ABCs in angiosperms. *Semin Cell Dev Biol* **21**: 100–107.
- Rijkema AS, Royaert S, Zethof J, Weerden G Van Der, Gerats T, Vandenbussche M.** 2006. Analysis of the Petunia *TM6* MADS Box Gene Reveals Functional Divergence within the *DEF/AP3* Lineage. *Gene* **18**: 1819–1832.
- Rounsley SD, Ditta GS, Yanofsky MF.** 1995. Diverse roles for MADS box genes in *Arabidopsis* development. *Plant Cell* **7**: 1259–1269.
- Running MP, Meyerowitz EM.** 1996. Mutations in the *PERIANTHIA* gene of *Arabidopsis* specifically alter floral organ number and initiation pattern. *Development* **122**: 1261–1269.

- Sakai H, Krizek B a, Jacobsen SE, Meyerowitz EM.** 2000. Regulation of *SUP* expression identifies multiple regulators involved in arabidopsis floral meristem development. *Plant Cell* **12**: 1607–1618.
- Sakamoto T, Kamiya N, Ueguehi-Tanaka M, Iwahori S, Matsuoka M.** 2001. KNOX homeodomain protein directly suppresses the expression of a gibberellin biosynthetic gene in the tobacco shoot apical meristem. *Genes Dev* **15**: 581–590.
- Sarojam Rajani and Venkatesan Sundaresan.** 2001. The *Arabidopsis* MYC/bHLH gene *ALCATRAZ* enables cell separation in fruit dehiscence. *Curr Biol* **11**: 1914–1922.
- Savidge B, Rounsley SD, Yanofsky MF.** 1995. Temporal relationship between the transcription of two *Arabidopsis* MADS box genes and the floral organ identity genes. *Plant Cell* **7**: 721–33.
- Schmidt A.** 1924. Histologische studien an phanerogamen vegetationspunkten. *Bot Arch* **8**: 345–404.
- Schoof H, Lenhard M, Haecker A, Mayer KF, Jürgens G, Laux T.** 2000. The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell* **100**: 635–44.
- Schruff MC, Spielman M, Tiwari S, Adams S, Fenby N, Scott RJ.** 2006. The *AUXIN RESPONSE FACTOR 2* gene of *Arabidopsis* links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs. *Development* **133**: 251–61.
- Schwab R, Ossowski S.** 2006. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **8**: 1121–1133.
- Scutt CP, Vinauger-Douard M, Fourquin C, Finet C, Dumas C.** 2006. An evolutionary perspective on the regulation of carpel development. *J Exp Bot* **57**: 2143–2152.
- Seo PJ, Hong S-Y, Kim S-G, Park C.** 2011. Competitive inhibition of transcription factors by small interfering peptides. *Trends Plant Sci* **16**: 541–9.
- Serino G, Deng X-W.** 2003. The COP9 signalosome: regulating plant development through the control of proteolysis. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 165–182.
- Serrani JC, Ruiz-Rivero O, Fos M, Garcia-Martinez JL.** 2008. Auxin-induced fruit-set in tomato is mediated in part by gibberellins. *Plant J* **56**: 922–934.

- Sessions A, Nemhauser JL, McColl a, Roe JL, Feldmann K a, Zambryski PC.** 1997. ETTIN patterns the Arabidopsis floral meristem and reproductive organs. *Development* **124**: 4481–4491.
- Shaw PJ, Brown JW.** 2004. Plant nuclear bodies. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 614–620.
- Shinohara H, Matsubayashi Y.** 2013. Chemical synthesis of arabidopsis CLV3 glycopeptide reveals the impact of hydroxyproline arabinosylation on peptide conformation and activity. *Plant Cell Physiol* **54**: 369–374.
- Shpak ED.** 2013. Diverse roles of ERECTA family genes in plant development. *J Integr Plant Biol* **55**: 1238–1250.
- Sicard A, Hernould M, Chevalier C.** 2008. The INHIBITOR OF MERISTEM ACTIVITY (IMA) protein: The nexus between cell division, differentiation and hormonal control of development. *Plant Signaling & behavior* **3**: 908–910.
- Sicard A, Petit J, Mouras A, Chevalier C, Hernould M.** 2008. Meristem activity during flower and ovule development in tomato is controlled by the mini zinc finger gene INHIBITOR OF MERISTEM ACTIVITY. *Plant J* **55**: 415–27.
- Skylar A, Hong F, Chory J, Weigel D, Wu X.** 2010. *STIMPY* mediates cytokinin signaling during shoot meristem establishment in Arabidopsis seedlings. *Development* **137**: 541–549.
- Smaczniak C, Immink RGH, Muiño JM, Blanvillain R, Busscher M.** 2012. Characterization of MADS-domain transcription factor complexes in *Arabidopsis* flower development. *Proc Natl Acad Sci.* **109**: 1560-1565
- Smyth DR, Bowman JL, Meyerowitz EM.** 1990. Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2**: 755–767.
- Soltis PS, Soltis DE.** 2014. Flower diversity and angiosperm diversification. *Flower Dev Methods Protoc* 85–102.
- Sorefan K, Girin T, Liljegren SJ, Ljung K, Robles P, Galva CS, Offringa R.** 2009. A regulated auxin minimum is required for seed dispersal in *Arabidopsis*. **459**.
- Souer E, van der Krol a, Kloos D, Spelt C, Bliiek M, Mol J, Koes R.** 1998. Genetic control of branching pattern and floral identity during *Petunia* inflorescence development. *Development* **125**: 733–742.
- Soyars CL, James SR, Nimchuk ZL.** 2016. Ready, aim, shoot: Stem cell regulation of the shoot apical meristem. *Curr Opin Plant Biol* **29**: 163–168.

- Staudt A-C, Wenkel S.** 2011. Regulation of protein function by “microProteins”. *EMBO Rep* **12**: 35–42.
- Steeves and Sussex.** 1989. Patterns in Plant Development. 405.
- Stewart WN, Rothwell GW.** 1993. *Paleobotany and the evolution of plants*. Cambridge University Press.
- Su L, Bassa C, Audran C, Cheniclet C, Chevalier C, Bouzayen, Roustan JP, Chervin C.** 2014. The auxin SI-IAA17 transcriptional repressor controls fruit size via the regulation of the endoreduplication-related cell expansion. *Plant and Cell Physiology* **55**: 1969–1976.
- Sun B, Ito T, Franks RG, Carolina N.** 2015. Regulation of floral stem cell termination in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci* **6**: 1–6.
- Sun B, Looi L, Guo S, He Z, Gan E, Huang J, Xu Y.** 2014. Timing Mechanism Dependent on Cell Division Is Invoked by Polycomb Eviction in Plant Stem Cells. *Science*. **343**: 505-514
- Sun B, Xu Y, Ng K-H, Ito T.** 2009. A timing mechanism for stem cell maintenance and differentiation in the *Arabidopsis* floral meristem. *Genes Dev* **23**: 1791–804.
- Sussex MI.** 1952. Regeneration of the potato shoot apex. *Nature* **170**: 755–757.
- Szemenyei H, Hannon M, Long J.** 2008. TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during *Arabidopsis* embryogenesis. *Science* **319**: 1384–1386.
- Tan QK, Irish VF.** 2006. The *Arabidopsis* Zinc Finger-Homeodomain Genes Encode Proteins with Unique Biochemical Properties That Are Coordinately Expressed during Floral Development. *Plant physiol* **140**: 1095–1108.
- Tao L, Cheung AY, Nibau C, Wu H.** 2005. RAC GTPases in tobacco and *Arabidopsis* mediate auxin-induced formation of proteolytically active nuclear protein bodies that contain AUX/IAA proteins. *Plant Cell* **17**: 2369–83.
- Tooke F, Ordidge M, Chiurugwi T, Battey N.** 2005. Mechanisms and function of flower and inflorescence reversion. *J Exp Bot* **56**: 2587–99.
- Tran LSP, Nakashima K, Sakuma Y, Osakabe Y, Qin F, Simpson SD, Maruyama K, Fujita Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K.** 2007. Co-expression of the stress-inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the *ERD1* gene in *Arabidopsis*. *Plant J* **49**: 46–63.
- Tsuchimoto S, Krol AR Van Der, Chua N.** 1993. Ectopic Expression of *pMADS3* in Transgenic *Petunia* Phenocopies the *Petunia blind* Mutant. *Plant Cell* **5**: 843–853..

- Turing AM.** 1952. The chemical basis of morphogenesis. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **237**: 145–181.
- Van der Knaap E, Chakrabarti M, Chu YH, Clevenger JP, Illa-Berenguer E, Huang Z, Keyhaninejad N, Mu Q, Sun L, Wang Y, et al.** 2014. What lies beyond the eye: the molecular mechanisms regulating tomato fruit weight and shape. *Front Plant Sci* **5**: 227.
- Van Der Krol a. R, Chua NH.** 1993. Flower Development in Petunia. *Plant Cell* **5**: 1195–1203.
- Vandenbussche M, Theissen G, Van de Peer Y, Gerats T.** 2003. Structural diversification and neo-functionalization during floral MADS-box gene evolution by C-terminal frameshift mutations. *Nucleic Acids Res* **31**: 4401–4409.
- Vandenbussche M, Zethof J, Royaert S, Weterings K, Gerats T.** 2004. The duplicated B-class heterodimer model: Whorl-specific effects and complex genetic interactions in *Petunia hybrida* flower development. *Plant Cell* **16**: 741–754.
- Varagona MJ, Schmidt, Robert J, Raikhel N V.** 1992. Nuclear localization signal(s) required for nuclear targeting of the maize regulatory protein Opaque-2. *Plant Cell* **4**: 1213–1227.
- Vaughan JG.** 1954. The morphology and growth of the vegetative and reproductive apices of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medic. and *Anagallis arvensis* L. *Bot J Linn Soc* **55**: 279–301.
- Von Hanstein JLER.** 1868. Die Scheitelzellgruppe MI Vegetationspunkt der Phanerogamen.
- Vrebalov J.** 2002. A MADS-Box Gene Necessary for Fruit Ripening at the Tomato *Ripening-Inhibitor (Rin)* Locus. *Science* **296**: 343–346.
- Vrebalov J, Pan IL, Arroyo AJM, McQuinn R, Chung M, Poole M, Rose J, Seymour G, Grandillo S, Giovannoni J, et al.** 2009. Fleshy fruit expansion and ripening are regulated by the Tomato *SHATTERPROOF* gene *TAGL1*. *Plant Cell* **21**: 3041–62.
- Wang H, Yin X, Li X, Wang L, Zheng Y, Xu X, Zhang Y, Wang X.** 2014. Genome-wide identification, evolution and expression analysis of the grape (*Vitis vinifera* L.) zinc finger-homeodomain gene family. *Int J Mol Sci* **15**: 5730–5748.
- Wang L, Hua D, He J, Duan Y, Chen Z, Hong X, Gong Z.** 2011. *Auxin response Factor2 (ARF2)* and its regulated homeodomain gene *HB33* mediate abscisic acid response in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* **7**.

- Wang W, Wu P, Li Y, Hou X.** 2015. Genome-wide analysis and expression patterns of ZF-HD transcription factors under different developmental tissues and abiotic stresses in Chinese cabbage. *Mol Genet Genomics* **291**: 1451–1464.
- Wang X, Feng S, Nakayama N, Crosby WL, Irish V, Deng W, Wei N.** 2003. The COP9 Signalosome Interacts with SCF UFO and Participates in *Arabidopsis* Flower Development. *Plant Cell* **15**: 1071–1082.
- Weber E, Engler C, Gruetzner R, Werner S, Marillonnet S.** 2011. A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PLoS One* **6**.
- Weigel D, Alvarez J, Smyth DR, Yanofsky MF, Meyerowitz EM.** 1992. *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell* **69**: 843–859.
- Weigel D, Meyerowitz E.** 1994. The ABCs of floral homeotic genes: Review. *Cell* **78**: 203–209.
- Wellmer F, Alves-Ferreira M, Dubois A, Riechmann JL, Meyerowitz EM.** 2006. Genome-wide analysis of gene expression during early *Arabidopsis* flower development. *PLoS Genet* **2**: 1012–1024.
- Wellmer F, Graciet E, Riechmann JL.** 2014. Specification of floral organs in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **65**: 1–9.
- Windhövel A, Hein I, Dabrowa R, Stockhaus J.** 2001. Characterization of a novel class of plant homeodomain proteins that bind to the C4 phosphoenolpyruvate carboxylase gene of *Flaveria trinervia*. *Plant Mol Biol* 201–214.
- Winter CM, Austin RS, Blanvillain-Baufumé S, Reback MA, Monniaux M, Wu MF, Sang Y, Yamaguchi A, Yamaguchi N, Parker JE, et al.** 2011. *LEAFY* Target Genes Reveal Floral Regulatory Logic, cis Motifs, and a Link to Biotic Stimulus Response. *Dev Cell* **20**: 430–443.
- Wuest SE, Maoileidigh DSO, Rae L, Kwasniewska K, Raganelli A, Hanczaryk K, Lohan AJ, Loftus B, Graciet E, Wellmer F.** 2012. Molecular basis for the specification of floral organs by *APETALA3* and *PISTILLATA*. *Proc Natl Acad Sci.* **109**: 13452-13457
- Xu C, Liberatore KL, Macalister CA, Huang Z, Chu Y, Jiang K, Brooks C, Ogawa-ohnishi M, Xiong G, Pauly M, et al.** 2015. A cascade of arabinosyltransferases controls shoot meristem size in tomato. *Nature Genetics* **47**: 784–792.

- Xu Y, Wang Y, Long Q, Huang J, Wang Y, Zhou K, Zheng M, Sun J, Chen H, Chen S, et al.** 2014. Overexpression of *OsZHD1*, a zinc finger homeodomain class homeobox transcription factor, induces abaxially curled and drooping leaf in rice. *Planta* **239**: 803–816.
- Xu YY, Wang XM, Li J, Li JH, Wu JS, Walker JC, Xu ZH, Chong K.** 2005. Activation of the *WUS* gene induces ectopic initiation of floral meristems on mature stem surface in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **57**: 773–784.
- Yadav RK, Perales M, Gruel J, Girke T, Jonsson H, and Reddy VG.** 2011. WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot apex. *Genes Dev* **25**:2025–2030.
- Yant L, Mathieu J, Dinh TT, Ott F, Lanz C, Wollmann H, Chen X, Schmid M.** 2010. Orchestration of the floral transition and floral development in *Arabidopsis* by the bifunctional transcription factor APETALA2. *Plant Cell* **22**: 2156–70.
- Ye Q, Zhu W, Li L, Zhang S, Yin Y, Ma H, Wang X.** 2010. Brassinosteroids control male fertility by regulating the expression of key genes involved in *Arabidopsis* anther and pollen development. *Proc Natl Acad Sci* **107**: 6100–6105.
- Yu H, Ito T, Zhao Y, Peng J, Kumar P, Meyerowitz EM.** 2004. Floral homeotic genes are targets of gibberellin signaling in flower development. *Proc Natl Acad Sci* **101**: 7827–7832.
- Yun J-Y, Weigel D, Lee I.** 2002. Ectopic expression of *SUPERMAN* suppresses development of petals and stamens. *Plant Cell Physiol* **43**: 52–57.
- Zhao Y, Medrano L, Ohashi K, Fletcher JC, Yu H, Sakai H, Meyerowitz EM.** 2004. HANABATARANU Is a GATA Transcription Factor That Regulates Shoot Apical Meristem and Flower Development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **16**: 2586–2600.
- Zhao L, Kim Y, Dinh TT, Chen X.** 2007. miR172 regulates stem cell fate and defines the inner boundary of APETALA3 and PISTILLATA expression domain in *Arabidopsis* floral meristems. *Plant J* **51**: 840–849.
- Zhao W, Guan C, Feng J, Liang Y, Zhan N, Zuo J, Ren B.** 2015. The *Arabidopsis* *CROWDED NUCLEI* genes regulate seed germination by modulating degradation of ABI5 protein. *J Integr Plant Biol* **58**: 669-678.
- Ziegelhoffer EC, Medrano LJ, Meyerowitz EM.** 2000. Cloning of the *Arabidopsis* *WIGGUM* gene identifies a role for farnesylation in meristem development. *Proc Natl Acad Sci* **97**: 7633–7638.

Zuniga-Mayo VM, Marsch-Martinez N, De Folter S. 2012. JAIBA, a class-II HD-ZIP transcription factor involved in the regulation of meristematic activity, and important for correct gynoecium and fruit development in *Arabidopsis*. *Plant J* **71**: 314–326.

Annexes

Communications

Communications orales

Norbert BOLLIER, Michel Hernould, Frédéric Delmas, Frédéric Gévaudant and Christian Chevalier (2016) CRISPR/Cas9 genome editing in tomato

Colloque International GENIUS « CRISPR-Cas9 technology in plant science », Paris (France) 25 novembre 2016

Norbert BOLLIER, Michel Hernould, Frédéric Delmas, Frédéric Gévaudant and Christian Chevalier (2016) CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of floral termination genes : a way to control fruit size ?

INRA GAFL - UR 1052, Avignon (France) 7 juin 2016

Norbert BOLLIER, Michel Hernould, Frédéric Delmas, Frédéric Gévaudant and Christian Chevalier (2016) Functional characterization of Mini Zinc Finger 2, a new adaptor peptide involved in floral development

Journées Jeunes Chercheurs du département Biologie et Amélioration des Plantes de l'INRA, Lyon (France) 11-12 avril 2016

Norbert BOLLIER, Michel Hernould, Frédéric Delmas and Christian Chevalier (2014) Mini Zinc Finger 2: a new interfering peptide involved in floral development.

8ème colloque jeune chercheurs de la Société Française de Biologie Végétale (SFBV), Tours (France) 25-27 juin 2014

Présentation de posters

Functional characterization of IMA/MIF2: a new regulator peptide involved in tomato and Arabidopsis floral development

Journées Jeunes Chercheurs du département Biologie et Amélioration des Plantes de l'INRA, Lyon (France) 11-12 avril 2016

Bollier N., Hernould M., Delmas F., Gévaudant F. and Chevalier Christian (2016) Functional characterization of Mini Zinc Finger 2, a new adaptor peptide involved in floral development

Journée de l'école Doctorale de Bordeaux, Arcachon (France), 6 Avril 2016

Bollier N., Hernould M., Delmas D., Gévaudant F. and Chevalier C. (2015) Functional characterization of IMA-SIKNU : a new complex involved in floral development

The 12th Solanaceae Conference, Bordeaux (France) 25-29 Octobre 2015

Bollier N., Hernould M., Delmas D., Gévaudant F. and Chevalier C. (2015) Functional characterization of IMA-SIKNU : a new complex involved in floral development

Synthetic Biology Congress, 20-21 Octobre 2015. Londres (Angleterre)

Bollier N., Hernould M., Delmas F., Gévaudant F. and Chevalier Christian (2015) Mini Zinc Finger 2: a new adaptor protein involved in floral development

Journée de l'école Doctorale de Bordeaux, Arcachon (France), 16 Avril 2015

Bollier N., Hernould M., Delmas F., Gévaudant F. and Chevalier Christian (2015) Mini Zinc Finger 2: a new adaptor protein involved in floral development

Plant organ Growth symposium, Ghent (Belgium), 10-12 mars 2015

Participations à des congrès (sans présentation)

7th RNA Club Workshop, Bordeaux (France) 25-26 Juin 2015

Synthetic Biology Bordeaux Symposium, Bordeaux (France) 20-21 novembre 2014

Participation à une émission de radio

Norbert BOLLIER, (2015) Les gènes impliqués dans la qualité de la tomate

RCF, “Que cherchent-ils” : Emission de vulgarisation scientifique présentée par Véronique de Poncheville : 11 mai 2015

Formation modules transverses

Module enseignement par l'enseignement

Séances d'apprentissage de l'enseignement : 4x4h (Encadrant : André Quintin)

Enseignement dans le cadre d'une équipe pédagogique 7x4h de Travaux Pratiques dans le cadre de l'UE « Du génome à la plante » du Master 1 Biologie et biotechnologie des plantes (Encadrant : Frédéric Gévaudant)

Module d'anglais scientifique

4 Séances de 3h (Apprentissage de la rédaction de publication scientifique, communication scientifique et exposé oral)

Module d'épistémologie et histoire des sciences

Enseignement : 7x3h (Encadrant Jérôme Pierrel)

Activité complémentaire (2015-2016)

Enseignement dans le cadre d'une équipe pédagogique 64h ETD :

- Travaux pratiques Master 1 Biologie et biotechnologie des plantes UE Du génome à la plante (24h)
- Travaux pratiques Licence 1 SVS UE Unité et diversité du vivant (10x4h)

Résumé

Implication des protéines adaptatrices IMA et MIF2 dans le développement floral chez *Solanum lycopersicum* et *Arabidopsis thaliana*

Les gènes *IMA* (*Inhibitor of Meristem Activity*) et *MIF2* (*MIni zinc Finger 2*) codent des protéines de la famille des « Mini zinc Finger » impliquées dans le développement et la réponse hormonale. Leur fonction est intimement liée à leur capacité d'interaction avec des protéines partenaires au travers de leur unique domaine, un doigt de zinc non-canonique. La génération et la caractérisation de plantes gain- et perte-de-fonction pour ces gènes chez *Solanum Lycopersicum* et *Arabidopsis thaliana* nous a permis de mettre en évidence leur homologie fonctionnelle dans le mécanisme d'arrêt de la prolifération des cellules souches méristématiques : la terminaison florale. Au cours du développement floral précoce, leur expression est induite par le facteur de transcription à MADS-BOX AGAMOUS. Les protéines codées sont capables d'interagir avec le facteur de transcription à doigt de zinc C₂H₂ KNUCKLES (KNU) et de recruter le co-facteur TOPLESS (TPL) ainsi que l'HISTONE DEACETYLASE19 (HDA19) pour former un complexe multimérique impliqué dans le remodelage de la chromatine. Ce complexe intervient ensuite afin de réprimer l'expression du régulateur majeur de la prolifération des cellules souches méristématiques WUSCHEL. Les travaux qui ont suivi ont permis de montrer qu'au-delà de leur intervention dans ce processus, les protéines IMA et MIF2 sont impliquées d'une manière plus générale dans le développement floral et l'organogenèse. Leur fonction de protéine adaptatrice étant sans doute permise par le désordre intrinsèque qui les caractérisent et qui leur permettrait une spécificité d'interaction avec divers partenaires protéiques.

Mots clés : *Arabidopsis*; tomate ; Mini Zinc Finger ; terminaison florale ; KNU ; Fruit

Abstract

Involvement of IMA and MIF2 adaptor proteins in floral development in *Solanum lycopersicum* and *Arabidopsis thaliana*

IMA (*Inhibitor of Meristem Activity*) and MIF2 (*MIni zinc Finger 2*) are two members of the Mini zinc Finger family (MIF) involved in the regulation of floral development and hormonal signaling pathways. Their ability to control physiological events is linked to their unique domain, a non canonical zinc finger, which confers to MIF the capacity to interact with other proteins. The characterization of gain- and loss-of-function lines for these genes in *Solanum lycopersicum* and *Arabidopsis thaliana* allowed us to unravel their functional homology in the termination of floral stem cell maintenance. During early floral development, *IMA* and *MIF2* gene expression is induced by the MADS-Box transcription factor AGAMOUS. Then, IMA and MIF2 proteins recruit the C₂H₂ zinc finger KNUCKLES (KNU), in a transcriptional repressor complex together with TOPLESS (TPL) and HISTONE DEACETYLASE19 (HDA19). This complex binds to the *WUSCHEL* (*WUS*) locus leading to *WUS* repression via a chromatin deacetylation mechanism. Further work allowed us to demonstrate that IMA and MIF2 play a wider role in floral development and organogenesis. Their function as adaptor protein is probably linked to their intrinsic disorder leading to structural flexibility and interaction specificity with a large range of partners.

Keywords : *Arabidopsis* ; tomato ; Mini Zinc Finger ; floral termination ; KNU ; Fruit