



HAL
open science

Interactions entre **ULTRAPETALA1** et les modifieurs et remodeleurs chromatinien : rôles dans le développement chez *Arabidopsis thaliana*

Caroline Thouly

► To cite this version:

Caroline Thouly. Interactions entre **ULTRAPETALA1** et les modifieurs et remodeleurs chromatinien : rôles dans le développement chez *Arabidopsis thaliana*. Biologie cellulaire. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2022. Français. NNT : 2022GRALV048 . tel-04861113

HAL Id: tel-04861113

<https://theses.hal.science/tel-04861113v1>

Submitted on 2 Jan 2025

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

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité Biologie cellulaire

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Caroline THOULY

Thèse dirigée par **Christel CARLES**
et codirigée par **Gilles VACHON**

préparée au sein du **Laboratoire LPCV – Laboratoire de
Physiologie Cellulaire Végétale**
Dans l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

**Interactions entre ULTRAPETALA1 et les
modifieurs et remodeleurs chromatinien :
Rôles dans le développement chez *Arabidopsis
thaliana***

**ULTRAPETALA1 interactions with chromatin
modifiers and remodelers: Roles in *Arabidopsis
thaliana* development**

Thèse soutenue publiquement le **8 juillet 2022**
Devant le jury composé de

Monsieur Alexandre BERR
CHARGE DE RECHERCHE, Université de Strasbourg, Rapporteur

Madame Valérie GAUDIN
DIRECTEUR DE RECHERCHE, INRAE, AgroParisTech, Rapporteur

Monsieur François ROUDIER, président du jury
PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS, ENS de Lyon, Examineur

Madame Fabienne HANS
MAITRE DE CONFERENCE, Université Grenoble Alpes, Examinatrice

Monsieur Gilles VACHON
CHARGE DE RECHERCHE, UGA, Co-directeur de thèse

Madame Christel CARLES
PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS, Université Grenoble Alpes, Directrice de thèse



Remerciements

Je remercie Cristel et Gilles, pour leur patience, pour leur bienveillance, pour leur confiance, et pour leur encadrement sur-mesure : vous m'avez toujours demandé mon avis sur comment vous pourriez faire pour m'aider, et vous vous êtes adaptés à mes façons de fonctionner, tout en étant exigeants, honnêtes et constructifs quand j'ai eu besoin d'améliorer mon travail pour atteindre les objectifs.

Je remercie les personnes qui m'ont appris à faire certaines manip, merci à Manu et François-Xavier, vous avez été de très bons profs qui m'ont bien aidée à être à l'aise avec une pipette dans les mains.

Je remercie les membres de l'équipe ChromDev avec qui j'ai travaillé pendant ces quatre ans, Merci à Marie pour ta gentillesse et ta bonne humeur, à Bob et ton enthousiasme, à Kateryna qui m'a montré où on pouvait mettre la barre, en termes de rigueur scientifique. Merci aux autres doctorants de l'équipe, Louise, JB et Vangeli.

Je remercie spécialement Gaby pour l'aide administrative que tu m'as apportée. Grâce à toi j'ai pu obtenir ma prolongation de contrat, malgré ma phobie des formulaires dématérialisés qui obligent à remplir parfois un peu n'importe quoi quand les champs définis ne sont pas tout à fait adaptés à ma situation.

Je remercie les membres de mon CSI, François, Gaby et Véronique, pour les discussions scientifiques stimulantes que l'on a eues, qui m'ont permis chaque année de refaire le plein de motivation.

Je remercie Alexandre Berr, Valérie Gaudin, Fabienne Hans et François Roudier pour avoir accepté de faire partie de mon jury et d'évaluer ce travail.

Je remercie Éric Maréchal, du LPCV, et je remercie toutes les personnes qui permettent au laboratoire de tourner.

Enfin, je remercie les ami-e-s qui m'ont bien aidée et accompagnée pour cette thèse, qui m'ont offert leur soutien, qui ont pris soin de moi quand je rentrais fatiguée de ma journée au labo, qui m'ont proposé des cadres de travail et des outils quand je n'arrivais pas à m'y mettre ou que je ne savais pas par quel bout commencer, qui m'ont fait des cours de méthodologie culinaire que j'ai pu transposer pour mon travail à la paillasse. Merci à Alicé, Zoï, Basile, Iuri, Annick, Bastien, Marianne, merci à mes camarades de radio. Et merci à mes parents, chez qui je me suis réfugiée pour la toute dernière ligne droite.

Résumé

Au cours du développement des organismes multicellulaires, des processus de reprogrammation de l'expression génique permettent l'émergence de types cellulaires distincts à partir d'une même cellule indifférenciée. Ces reprogrammations géniques mettent en œuvre les complexes protéiques des groupes Polycomb (PcG) et Trithorax (TrxG), qui modifient la structure de la chromatine pour des effets respectivement répresseur et activateur.

Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, les méthyltransférases d'histone (HMT) CURLY LEAF (CLF) et SWINGER (SWN) du Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) répriment les gènes par le dépôt de la marque de triméthylation sur la Lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3). La déméthylase d'histone (HDMT) RELATIVE OF EARLY FLOWERING 6 (REF6) peut contrecarrer cette répression par le retrait actif de la marque H3K27me3. Le remodeleur BRAHMA (BRM) peut également contrecarrer la répression induite par le complexe PRC2, par le déplacement des nucléosomes et l'ouverture de la chromatine. Chacun de ces effecteurs chromatinien contribue à la régulation de nombreux gènes qui sont activés dans des contextes différents les uns des autres. Les mécanismes qui confèrent une spécificité de *locus* et de contexte spatial ou temporel à l'activité de CLF/SWN, REF6 et BRM ne sont pas pleinement élucidés, et les facteurs qui permettent la commutation des gènes d'un état réprimé vers actif et vice-versa ne sont pas connus.

La protéine à domaine SAND ULTRAPETALA1 (ULT1) induit la sortie de plus de 900 gènes cibles d'un état réprimé en contrecarrant l'action de CLF, et réduisant ainsi le niveau des marques H3K27me3 à leur *locus*. Parmi ces cibles se trouvent les gènes homéotiques floraux *AGAMOUS* (*AG*), *APETALA3* (*AP3*) et *SEPALLATA3* (*SEP3*), dont ULT1 permet l'activation dans les tissus floraux appropriés. Parce qu'ULT1 ne présente pas de domaine enzymatique qui permettrait une modification directe de la structure de la chromatine, son mode d'action pourrait faire intervenir des facteurs chromatinien.

Le but de mes travaux de thèse a été d'élucider comment ULT1 pourrait participer à la régulation de gènes cibles en interagissant d'une part avec les enzymes qui déposent ou retirent la marque H3K27me3 et d'autre part avec le remodeleur BRM.

Dans une première partie, je me suis intéressée aux interactions génétiques entre ULT1 et REF6, et j'ai pu montrer qu'ULT1 et REF6 avaient une action indépendante sur la dé-répression des gènes, incluant les facteurs homéotiques floraux. J'ai ensuite étudié *in vivo* l'interaction entre ULT1 et les deux méthyltransférases CLF et SWN. J'ai démontré par test de double hybride de levure que les domaines SAND et CW-like d'ULT1 et les domaines situés en N-terminal du domaine catalytique de CLF et SWN étaient suffisants pour permettre l'interaction physique entre ces partenaires. Ces résultats indiquent qu'ULT1 pourrait directement inhiber l'activité CLF/SWN, plutôt qu'induire une déméthylation active de la marque H3K27me3 de concert avec REF6.

Dans une deuxième partie, je me suis intéressée aux interactions moléculaires et génétiques entre ULT1/2 et les remodeleurs BRM et son homologue SPLAYED (*SYD*). J'ai mis en évidence

une interaction directe *in vivo*, et j'ai montré que les domaines situés en N-terminal du domaine catalytique de BRM et SYD étaient suffisants pour permettre l'interaction physique avec ULT1. Une analyse génétique a montré que l'interaction entre les voies *ULT1/2* et *BRM* était antagoniste pour la régulation du temps de floraison et du nombre d'organes dans les trois premiers verticilles de la fleur, et synergique pour le contrôle du déterminisme floral. De plus, l'activation de gènes homéotiques floraux par ULT1 reste possible en l'absence de la fonction *brm*, ce qui indique que les voies ULT1 et remodeleur à ATPase sont indépendantes dans ce processus. L'ensemble de ces résultats montre qu'ULT1 et BRM interagissent selon des modalités différentes en fonction des processus développementaux considérés.

Summary

During the development of multicellular organisms, switches in gene expression allow different cell types to emerge from a same undifferentiated cell. These switches involve protein complexes of the Polycomb (PcG) and Trithorax (TrxG) groups that modify the chromatin structure with repressive and activating effects, respectively.

In the model plant *Arabidopsis thaliana*, CURLY LEAF (CLF) and SWINGER (SWN), two histone methyltransferases (HMT) of the Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2), repress gene expression via the deposition of a trimethyl mark on lysine 27 of histone H3 (H3K27me3). The histone demethylase (HDMT) RELATIVE OF FLOWERING6 (REF6) can counteract this repression by actively removing the H3K27me3 mark. The ATPase remodeler BRAHMA (BRM) can also counteract the PRC2-mediated repression, by displacing nucleosomes and opening the chromatin. All these chromatin effectors contribute to the regulation of many genes, each of them being specific of various contexts. The mechanisms that confer *locus* and spatial or temporal context specificity to the activity of CLF/SWN, REF6 and BRM are not fully elucidated, and the factors that allow the switch of genes from a repressed to an active state (and vice versa) are not known.

The SAND domain protein ULTRAPETALA1 (ULT1) induces the switch of more than 900 target genes from a repressed to an active state, by counteracting the action of CLF, thereby reducing the level of H3K27me3 marks at their *locus*. These targets include the floral homeotic genes *AGAMOUS* (*AG*), *APETALA3* (*AP3*) and *SEPALLATA3* (*SEP3*), which ULT1 enables to be activated in appropriate floral tissues. Because ULT1 lacks enzymatic domains that could be responsible for a direct alteration of the chromatin structure, its mode of action could thus involve chromatin effectors.

Therefore, the goal of my thesis was to investigate how ULT1 could contribute to the regulation of its target genes via an interaction with enzymes that add (HMTs) or remove (HDMTs) the H3K27me3 mark on one hand, and with the remodeler BRM on the other hand.

First, I studied the genetic interaction between ULT1 and REF6, and demonstrated that ULT1 and REF6 act independently from one another on the de-repression of homeotic floral genes. I then studied *in vivo* the interaction between ULT1 and the two methyltransferases CLF and SWN. I demonstrated by yeast two-hybrid assay that the SAND and CW-like domains of ULT1 and the N-terminal domains of the catalytic domain of CLF and SWN were sufficient to allow the physical interaction between these partners. These results indicate that ULT1 could directly inhibit CLF/SWN activity rather than contributing to an active demethylation with REF6.

Second, I investigated the molecular and genetic interactions between ULT1/2 and the remodelers BRM and its homolog SPLAYED (SYD). I could detect a physical interaction *in vivo* and I showed that the N-terminal parts of BRM and SYD catalytic domains were sufficient to mediate physical interaction with ULT1. A genetic analysis showed that the interaction between the *ULT1/2* and *BRM* pathways is antagonistic regarding the regulation of flowering time and organ number within the three first floral whorls, while synergetic for the control of

floral determinacy. Furthermore, ULT1 can still activate floral homeotic genes in a brm loss-of-function context, indicating that the ULT1 and ATPase remodeler pathways are independent in this process. Altogether, these results show that ULT1 and BRM interact via different modalities depending on the considered developmental process.

Abréviations

35S : Promoteur de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur

aa : Acides aminés

BiFC : "Bimolecular fluorescence complementation", complémentation de fluorescence bimoléculaire

ADN : Acide désoxyribonucléique

AG : AGAMOUS

AGL24 : AGAMOUS-LIKE 24

AP1/2/3 : APETALA1/2/3

ARN : Acide ribonucléique

ARR : ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR

AS1/2 : ASYMETRICAL LEAVES 1

ATP : Adénosine triphosphate

BRM : BRAHMA

ChIP-seq : "Chromatin immunoprecipitation - sequencing", immunoprécipitation de la chromatine suivie d'un séquençage haut débit

ChIP-qPCR : "Chromatin immunoprecipitation – quantitative polymerase chain reaction", immunoprécipitation de la chromatine suivie d'une PCR quantitative

CK : Cytokinine

CLF : CURLY LEAF

CLV1/2/3 : CLAVATA 1/2/3

CMM : "Carpel margin meristem", Méristème de la marge du carpelle

CO : CONSTANS

Col-0 : Columbia-0

CRC : CRABS CLAW

CRISPR-Cas9 : Clustered regularly interspaced short palindromic repeats - CRISPR associated protein 9

CRN : CORYNE

Dex : Dexaméthasone

ELF6 : EARLY FLOWERING 6

EMF1/2 : EMBRYONIC FLOWER 1/2

EMS : Ethyl methanesulfonate, un composé mutagène utilisé pour obtenir des mutations ponctuelles aléatoires

EMSA : Electromobility shift assay, gel retard

FIE : FERTILIZATION INDEPENDANT ENDOSPERM

FIS2 : FERTILIZATION-INDEPENDENT SEED 2

FLC : FLOWERING *LOCUS* C

FRI : FRIGIDA

FT : FLOWERING *LOCUS* T

GA : Gibbérelline

GR : Récepteur des glucocorticoïdes

HA : Human influenza hemagglutin

HMT : "Histone methyltransferase", méthyltransférase d'histone

HDMT : "Histone demethylase", déméthylase d'histone

IPT: ISOPENTENYLTRANSFERASE

IP-MS : "Immunoprecipitation-mass spectrometry", immunoprécipitation suivie d'une analyse par spectrométrie de masse

JMJ : "Jumonji domain containing protein," protéine à domaine Jumonji

KAN1/2 : KANADI 1/2
KNAT1/2/4/6 : KNOTTED-LIKE FROM ARABIDOPSIS THALIANA 1/2/4/6
KNOX1 : Class I Knotted1-like-homeobox
KNU : KNUCKLES
Ler : Landsberg erecta
LFY : LEAFY
LHP1 : LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1
lncRNA : ARN long non codant
LOG : LONELY GUY
MAC : Méristème apical caulinaire
MAR : Méristème apical racinaire
MEA : MEDEA
MSI1-5 : MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA 1-5
pb : Paires de bases
PcG : "Polycomb Group", groupe Polycomb
PCR : "Polymerase Chain Reaction", réaction de polymérisation en chaîne
PHD : Plant homeodomain
PI : PISTILLATA
PRC1/2 : Polycomb Repressive Complex 1/2
REF6 : RELATIVE OF EARLY FLOWERING 6
RNA-seq : "RNA sequencing", séquençage haut débit de l'ARN
RT-qPCR : Rétro-transcription suivie d'une PCR quantitative
SEP1/2/3/4 : SEPALLATA1/2/3/4
SHP1/2 : SHATTERPROOF 1/2
SOC1 : SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1
STM : SHOOT MERISTEMLESS
SVP : SHORT VEGETATIVE PHASE
SYD : SPLAYED
SWI2/SNF2 : SWITCH/SUCROSE NON FERMENTABLE 2
SWN : SWINGER
TFL1 : TERMINAL FLOWER 1
TrxG : "Trithorax group", groupe Trithorax
TSS : "Transcription start site", site de démarrage de la transcription
UIF1 : ULTRAPETALA INTERACTING FACTOR 1
ULT1/2 : ULTRAPETALA 1/2
VIN3 : VERNALIZATION INSENSITIVE 3
VRN2/5 : VERNALIZATION 2/5
WT : "Wild Type", sauvage
WUS : WUSCHEL
YFP : Yellow fluorescent protein
ZnF : Zinc finger, domaine à doigt de zinc
ZC : Zone centrale
ZM : Zone médullaire
ZP : Zone périphérique

Table des matières

I Introduction.....	2
I-A Le développement des plantes : émergence continue de tissus et cellules variés, régie par des profils d'expression génique contrôlés dans l'espace et dans le temps	2
I-A-1 Les différentes phases du développement aérien de la plante mettent en jeu différents types de méristèmes.	2
I-A-2 Structure et fonctionnement des méristèmes aériens	3
I-A-3 La transition florale : intégration de signaux environnementaux et endogènes pour la conversion du méristème végétatif en méristème inflorescentiel.....	7
I-A-4 La morphogenèse florale : mise en place d'organes floraux aux structures et fonctions spécialisées	11
I-B L'expression génétique est contrôlée au niveau de la chromatine	18
I-B-1 Historique de la découverte des groupes Polycomb et Trithorax, répresseurs et activateurs chromatinien de gènes homéotiques	19
I-B-2 Des combinaisons variées de marques histones forment un nombre limité d'états chromatinien.	19
I-B-3 L'ajout et le retrait de marques épigénétiques, catalysés par des enzymes, permet les reprogrammations transcriptionnelles qui ont lieu au cours du développement.....	20
I-B-4 Les remodeleurs affectent la dynamique des nucléosomes.....	29
I-B-5 Le recrutement des facteurs chromatinien	31
I-B-6 Dialogue entre différentes modifications chromatinien	33
I-C ULTRAPETALA1 (ULT1), un régulateur chromatinien impliqué dans la levée de la répression médiée par PcG aux gènes développementaux	38
I-C-1 ULT1, un facteur impliqué dans l'homéostasie du méristème	38
I-C-2 ULT1 possède un homologue chez Arabidopsis (ULT2), qui lui est partiellement redondant	40
I-C-3 ULT1, une protéine à domaine SAND.....	40
I-C-4 ULT1, un antagoniste du complexe PRC2.....	40
I-D Objectifs de la thèse.....	44
II Matériel et méthodes.....	46
II-A Matériel.....	46
Matériel végétal	46
Bactéries et levures.....	46
Oligonucléotides	46

Plasmides	47
II-B Méthodes	48
Conditions de cultures des plantes	48
Extraction d'ADN	48
Génotypage	48
Purification d'ARN et préparation d'ADNc	49
PCR quantitative	49
Tests en double hybride de levure	49
III Résultats et discussion	52
III-A Interactions entre ULT1 et les modifieurs de la chromatine	52
III-A-1 Interactions entre ULT1 et les déméthylases d'H3K27me3	52
III-A-2 Interactions physiques entre ULT1 et le complexe PRC2	64
III-A-2-iii CLF et SWN interagissent avec la partie N-terminale d'ULT1, en amont du domaine B-box-like	69
Conclusion	72
III-B Interaction entre ULT1 et les remodeleurs de la chromatine	73
ULT1 et BRM, deux acteurs qui jouent un rôle anti-PRC2	73
Article : les facteurs TrxG ULTRAPETALA1/2 et BRAHMA jouent des rôles indépendants et synergiques pendant le développement d' <i>A. thaliana</i>	75
ULT1 interagit physiquement avec SYD	95
Identification de gènes cibles pour ULT1/2 et BRM lors du développement des carpelles	96
Conclusion	97
IV Discussion générale	100
IV-A Lien entre ULT1 et le dépôt de la marque H3K27me3 par le PRC2	100
IV-A-1 ULT1 induit une dé-répression de ses gènes cibles (dont les MADS de la fleur) indépendamment de la déméthylase JMJ spécifique d'H3K27me3, REF6	100
IV-A-2 ULT1 pourrait contrer le dépôt de la marque H3K27me3 via une interaction physique avec le complexe PRC2	101
IV-B ULT1 interagit physiquement et génétiquement avec BRM	103
IV-B-1 L'Interaction physique entre ULT1 et BRM s'accompagne d'une interaction génétique synergique pour le développement du gynécée	103
IV-B-2 Les interactions génétiques entre BRM et ULT1 sont antagonistes ou synergiques, selon les phénomènes développementaux étudiés	104
IV-B-3 ULT1 pourrait interagir de façon redondante avec BRM et SYD	106

IV-C ULT1 pourrait jouer un rôle dans la régulation chromatinienne des gènes environnementaux.	106
IV-D Conclusion générale.....	107
V Références.....	110

INTRODUCTION

I Introduction

I-A Le développement des plantes : émergence continue de tissus et cellules variés, régie par des profils d'expression génique contrôlés dans l'espace et dans le temps

Les plantes à fleurs, comme les animaux, sont des organismes complexes, composés de d'organes, de tissus et de cellules variés qui remplissent des fonctions différentes les uns des autres. Par exemple, les feuilles, qui sont le siège de la photosynthèse, contiennent de la chlorophylle, alors que ce n'est pas le cas des pétales des fleurs, qui jouent un rôle dans la reproduction et peuvent contenir d'autres pigments, responsables de leur couleur. Pourtant les cellules de pétale comme les cellules de fleur renferment le même ADN, qui code pour les mêmes gènes. Les différences observées entre pétales et feuilles s'expliquent par le fait que certains gènes sont exprimés spécifiquement dans les feuilles et réprimés dans les pétales, et que d'autres gènes sont à l'inverse exprimés dans les pétales et réprimés dans les feuilles.

Les cellules spécialisées d'un organisme adulte animal ou végétal sont toutes issues d'une cellule de zygote unique qui s'est divisée par mitoses successives, et dont la descendance a été intégrée dans différents territoires, et a acquis des caractéristiques de cellules différenciées.

Chez les animaux, les tissus variés qui composent les différents organes sont principalement mis en place pendant l'embryogenèse, pendant laquelle s'établit le plan d'organisation. Au contraire, chez l'angiosperme modèle *Arabidopsis thaliana*, dont le développement est caractéristique de celui de l'ensemble végétaux multicellulaires, l'embryon présente une structure rudimentaire et l'organogenèse se poursuit pendant toute la phase post-embryonnaire. Des réserves de cellules indifférenciées sont conservées pendant toute la vie de la plante dans les méristèmes apicaux caulinaires et racinaires (MAC et MAR, respectivement), permettant cette organogenèse continue. Une autre particularité du développement végétal est liée au fait que les cellules sont entourées d'une paroi rigide, ce qui les lie mécaniquement à leurs voisines et rend les migrations cellulaires impossibles : leur position relative au sein de l'organisme ne peut changer que lorsqu'elles sont poussées par des cellules nouvellement produites. Au sein des méristèmes, la descendance des cellules est incorporée dans les organes de la partie aérienne ou racinaire de la plante.

Cette partie de l'introduction décrit les mécanismes moléculaires conduisant à l'activation et la répression de gènes d'une façon coordonnée pour permettre, à partir de cellules indifférenciées, la production de feuilles (à partir d'un méristème végétatif), puis de fleurs (à partir d'un méristème inflorescentiel.)

I-A-1 Les différentes phases du développement aérien de la plante mettent en jeu différents types de méristèmes

Le méristème apical caulinaire (MAC) est une structure en forme de dôme, mise en place au cours de l'embryogenèse, qui est à l'origine de toutes les cellules des parties aériennes de la plante. Après germination, le MAC produit de façon itérative des modules appelés phytomères. Un phytomère est composé d'un nœud auquel est attaché une feuille, d'un

méristème axillaire qui se développe à la base de la feuille, et d'une portion de tige située entre deux nœuds consécutifs appelée entre-nœud. Les méristèmes axillaires ont une structure et un fonctionnement identique à celui du MAC, et sont à l'origine des ramifications de la plante. (Carles and Fletcher, 2003).

Après une phase de développement végétatif pendant laquelle les méristèmes aériens (méristème apical et méristèmes axillaires) produisent des feuilles et de nouveaux méristèmes axillaires, l'intégration de signaux environnementaux et endogènes provoquent une transition vers une phase reproductive du développement. Les méristèmes végétatifs sont alors convertis en méristèmes d'inflorescence, qui produisent à leur aisselle non plus de feuilles et de nouveaux méristèmes végétatifs, mais des méristèmes floraux. Les méristèmes floraux produisent les quatre types d'organes dont sont composées les fleurs : pétales, sépales, étamines et carpelles, selon un mécanisme de maintenance similaire à celui qui permet la production de feuilles par les méristèmes végétatifs (Carles and Fletcher, 2003).

I-A-2 Structure et fonctionnement des méristèmes aériens

Le développement continu des plantes requiert le maintien des populations de cellules souches au sein des méristèmes végétatifs puis inflorescentiels tout au long de la vie de la plante : les cellules qui sont intégrées au sein d'ébauches d'organes latéraux, feuilles ou méristèmes floraux, doivent être renouvelées, afin de maintenir une population de cellules souches constante. Cette homéostasie des méristèmes est finement régulée, leur conférant une structure stable, divisée en plusieurs couches et territoires, chacun formé par des cellules aux caractéristiques différentes (Steeves and Sussex, 1989).

Les méristèmes aériens sont divisés en différents territoires fonctionnels

On distingue au niveau des méristèmes aériens de la plante modèle *A. thaliana* deux couches de cellules, appelées L1 et L2, qui se divisent de façon anticline, c'est-à-dire que le plan de division est perpendiculaire à la surface du méristème. L'ensemble de ces deux couches est appelé tunique, tandis que les cellules sous-jacentes de la L3, qui se divisent dans toutes les directions, forment le corpus (**Figure 1**). Les cellules de la couche L1 sont à l'origine des cellules épidermiques qui recouvrent l'ensemble des tiges et organes aériens. Des expériences ont été menées sur des méristèmes chimères, réunissant des cellules de tunique et de corpus issus d'espèces différentes, ce qui a permis d'identifier et de suivre leur descendance. D'une part, ces expériences ont permis de montrer qu'en cas d'ablation des cellules des couches externes L1 et L2, des cellules provenant du corpus pouvaient les remplacer et être ainsi intégrées à l'épiderme. D'autre part, lorsque les cellules de la tunique se divisent de façon sporadique d'une manière péricline, c'est-à-dire parallèlement à la surface du méristème, les cellules filles situées en profondeur deviennent des cellules de corpus. Ainsi, l'identité des cellules des différentes couches L1-L2-L3 dépend de leur position au sein du méristème, et leur devenir n'est pas définitivement fixé par la lignée dont elles sont originaires (Szymkowiak and Sussex, 1996).

A cette organisation du méristème en couches, se superpose une organisation en différents territoires dans lesquels les cellules diffèrent par leur vitesse de division cellulaire et par leur devenir.

Sur la partie la plus apicale du méristème, les cellules de la zone centrale (ZC), considérées comme les cellules souches des méristèmes, ont un rythme de division lent et leurs mitoses produisent des cellules qui vont soit rester dans cette zone et permettre son maintien, soit se retrouver dans la zone périphérique (ZP) ou dans la zone médullaire (ZM), et changer alors de devenir (Steeves and Sussex, 1989) (**Figure 1**). Les cellules de la ZP subissent des divisions rapides qui permettent une amplification de ces populations cellulaires, et sont consommées lorsqu'elles sont intégrées aux ébauches d'organes qui émergent du méristème apical. Les cellules de la ZM, dans la partie la plus basale du méristème, sont à l'origine des tissus qui composent les tiges.

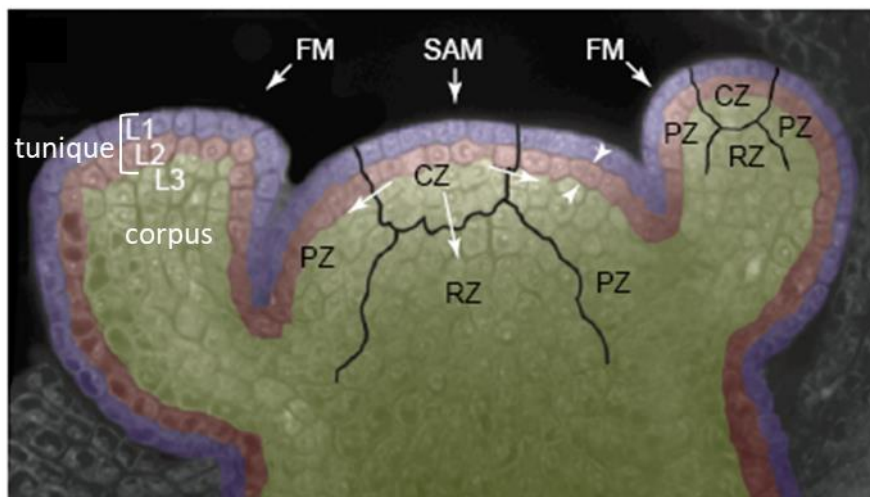


Figure 1 : Découpage des méristèmes aériens en domaines fonctionnels. Les couches L1 et L2, composées de cellules qui se divisent selon une orientation anticlinale forment la tunique tandis que les cellules plus internes forment le corpus. CZ : zone centrale, PZ zone périphérique, RZ : Rib Zone, zone médullaire en français. Les flèches blanches à l'intérieur du méristème représentent les flux de cellules, produites par la CZ, qui intègrent la PZ et la RZ. Le découpage fonctionnel des méristèmes apicaux en couches L1/L2/L3 et en domaines fonctionnels CZ/PZ/RZ est valable à la fois pour le méristème apical (Shoot Apical Meristem, SAM en anglais) et pour les méristèmes floraux (FM) produits sur les flancs du SAM. Adapté de (Carles and Fletcher, 2003).

Le fonctionnement des méristèmes aériens végétatifs et inflorescentiels met donc en jeu des zones fonctionnelles qui sont traversées par des flux de cellules poussées vers l'extérieur du méristème au cours des divisions cellulaires, mais dont les dimensions et le nombre de cellules qu'elles contiennent restent constantes au fil du temps. Les cellules souches de la ZC deviennent des cellules de la ZP, en division rapide, avant d'être incorporées dans les ébauches de feuilles ou de fleurs et devenir des cellules différenciées. Ces cellules reçoivent donc des signaux positionnels qui les font transiter d'un état à un autre. A un niveau moléculaire, les différences entre les cellules du méristème et celles des ébauches d'organes sont associées à l'expression de gènes distincts (Mahajan and Yadav, 2020).

Maintien de l'homéostasie du méristème par la boucle WUS – CLV

Le fait que le méristème puisse conserver une taille et une organisation constante malgré les flux de cellules qui le traversent nécessite un équilibre entre la quantité de cellules produites dans la ZC et la quantité de cellules consommées depuis la ZC pour alimenter la ZP puis être incorporés dans les ébauches d'organes. Le facteur de transcription à homéodomaine WUSCHEL (WUS) (Mayer et al., 1998) est un déterminant clé de l'identité des cellules souches : il est requis pour le maintien des méristèmes apicaux, puisque les méristèmes des mutants perte-de-fonction *wus* s'épuisent et disparaissent après la production de quelques organes latéraux (Laux et al., 1996). De plus, son expression ectopique est suffisante pour causer la dé-différentiation d'ébauches foliaires en cellules souches de l'appareil caulinaire (Schoof et al., 2000). Ce facteur est exprimé dans une zone restreinte du méristème, appelée centre organisateur (CO) (Mayer et al., 1998), mais la protéine est capable de se déplacer vers les cellules localisées plus haut dans le méristème (Yadav et al., 2011).

A l'inverse de WUS, la voie régulatrice impliquant les gènes *CLAVATA1, 2* et *3* (*CLV1/2/3*) limite l'expansion des méristèmes : les méristèmes des mutants perte-de-fonction *clv* s'élargissent au cours du temps (Clark et al., 1997). *CLV3* est exprimé dans les cellules de la zone centrale (Fletcher et al., 1999), et code pour une protéine qui donne, après protéolyse, un court peptide diffusible (Ni and Clark, 2006). *CLV1*, qui est exprimé dans l'ensemble des couches internes du méristème, code pour un récepteur kinase (Clark et al., 1997). Enfin, *CLV2* possède un domaine extracellulaire responsable de la reconnaissance du peptide signal, et s'assemble avec la protéine kinase CORYNE (CRN), formant ainsi un module récepteur-kinase (Müller et al., 2008) (Figure 2).

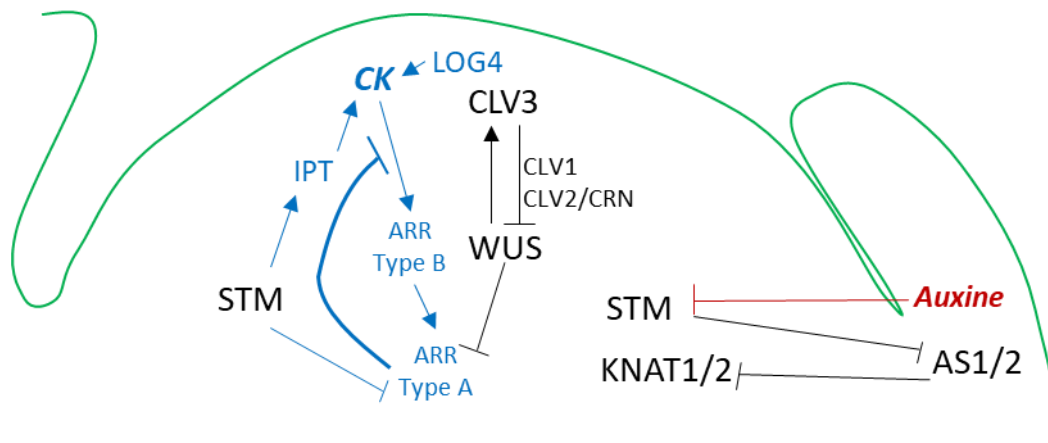


Figure 2 : Contrôle génétique et hormonal de l'homéostasie des méristèmes aériens. Les noms et les rôles des différents acteurs représentés sur la figure sont expliqués dans le texte du manuscrit.

L'homéostasie du méristème repose sur une boucle de rétrocontrôle négatif entre WUS et la voie CLV. WUS diffuse depuis le centre organisateur vers la ZC, où il peut activer l'expression de *CLV3* par liaison directe au promoteur de ce gène (Yadav et al., 2011). L'activation des récepteurs *CLV1* et *CLV2/CRN* par la liaison au peptide *CLV3* qui diffuse depuis la zone centrale permet quant à elle la répression de *WUS* (Schoof et al., 2000). *CLV3* est séquestré par ses

récepteurs lors de sa diffusion vers les couches inférieures du méristème : ainsi, la zone d'expression de *WUS* dans le méristème est limitée aux cellules du centre organisateur qui ne reçoivent pas le peptide CLV3 (Lenhard and Laux, 2003) (**Figure 2**).

Les mécanismes qui permettent le maintien des cellules souches du méristème apical caulinaire ressemblent au modèle de la niche, proposé pour le maintien des cellules souches animales : les cellules sont maintenues dans un état souche lorsqu'elles reçoivent des signaux qui empêchent leur différenciation. Ces signaux sont produits par des cellules voisines, appelées cellules de niche, et se différencient lorsqu'elles ne sont plus exposées à ces signaux. Ici, c'est le centre organisateur qui joue le rôle de niche, et les cellules s'engagent dans la différenciation lorsque les divisions cellulaires les poussent en-dehors de la zone de diffusion du signal *WUS* (Heidstra and Sabatini, 2014).

Antagonisme entre gènes *KNOX1* et facteurs liés à la différenciation des ébauches d'organes

Le facteur de transcription à homéodomaine SHOOT MERISTEMLESS (*STM*) de la famille *KNOX1* agit en parallèle de *WUS* (Lenhard et al., 2002) dans la spécification des tissus méristématiques. En effet, son expression est restreinte aux cellules méristématiques et exclue des ébauches d'organes latéraux, et les mutants *stm* ne parviennent pas à générer un méristème apical au cours de l'embryogenèse (Long et al., 1996). À l'opposé, les facteurs de transcription à domaine MYB ASYMETRYCAL LEAVES 1 (*AS1*) et *AS2* voient leur expression activée spécifiquement dans les ébauches d'organes. Chez les mutants *stm*, *AS1* et *AS2* sont exprimés de façon ectopique dans le méristème tandis que chez les mutants *as1*, (*BREVIPEDICELLUS/KNOTTED-LIKE FROM ARABIDOPSIS THALIANA*) (*BP/KNAT1*) et *KNAT2* sont surexprimés dans les feuilles (Byrne et al., 2000, 2002). *BP* et *KNAT2* sont comme *STM* des facteurs de transcription de la famille *KNOX1*, et leur expression est restreinte au méristème chez les plantes sauvages. Il existe donc un antagonisme entre les facteurs méristématiques *KNOX1* et les facteurs de différenciation des ébauches *AS1/2*, qui se répriment mutuellement, et il est proposé que *STM* puisse permettre le maintien du méristème, en empêchant la différenciation précoce de ces cellules (**Figure 2**).

Connections entre contrôle transcriptionnel et hormonal du méristème apical

Les devenir des cellules au sein du méristème apical caulinaire dépendent donc des gènes qu'elles expriment, cette expression étant régulée par des informations positionnelles reçues sous forme de facteurs diffusibles, comme le peptide signal CLV3 ou le facteur de transcription *WUS*. Diverses hormones jouent également un rôle dans le contrôle du méristème et de l'expression des facteurs de transcription. De façon réciproque, l'expression de facteurs de transcription peut influencer sur les signaux hormonaux en régulant l'expression des enzymes qui permettent la synthèse ou la dégradation des hormones, des transporteurs des hormones, et/ou des récepteurs hormonaux et des protéines qui permettent la transduction du signal (Eshed Williams, 2021; Shi and Vernoux, 2022).

Chez les végétaux, les cytokinines (*CK*) sont des hormones qui promeuvent la division cellulaire (Skoog and Miller, 1957), et dont l'application ectopique peut sauver les phénotypes *stm* (Yanai et al., 2005). Le gène codant pour l'enzyme finale de la voie de biosynthèse des *CK*,

LONELY GUY (LOG), est exprimé au sein des méristèmes dans les cellules souches de la zone centrale : il existerait donc un gradient descendant de CK au sein du méristème (Chickarmane et al., 2012). La réponse des cellules exposées aux CK dépend de la présence des protéines de type Arabidopsis Response Regulators (ARR) : les ARR de Type B sont des facteurs de transcription qui activent les gènes de réponse aux CK, tandis que les ARR de Type A inhibent la réponse des cellules aux CK, participant ainsi à un rétrocontrôle négatif de la voie des CK. L'expression de *WUS* est activée par les CK via la liaison d'un ARR de type B à son promoteur (Xie et al., 2018), et la protéine *WUS* réprime l'expression d'un ARR inhibiteur de type A (Leibfried et al., 2005). STM promeut également l'expression d'une enzyme de la voie de synthèse des cytokinines, IPT7, et la répression d'un ARR inhibiteur de la réponse CK (Yanai et al., 2005). Il existe donc un rétrocontrôle positif entre *WUS/CLV* et la voie des CKs dans le maintien des cellules souches au méristème (**Figure 2**).

L'auxine est quant à elle est une hormone associée à la différenciation cellulaire. Les ébauches d'organes latéraux émergent au niveau de la zone centrale du méristème aux points où les concentrations en auxine sont maximales, et l'application d'auxine exogène sur le MAC provoque l'apparition d'une ébauche au niveau de la zone d'application (Reinhardt et al., 2000). Les pics d'auxine qui induisent la production des ébauches peuvent se constituer grâce à l'action de transporteurs polarisés. Ces transporteurs permettent, par une circulation directionnelle de l'auxine, son accumulation dans des zones spécifiques et sa déplétion dans les zones adjacentes (Reinhardt et al., 2000). Dans le cas des méristèmes floraux, il a été démontré que plusieurs AUXIN RESPONSE FACTORS (ARF), activés par l'auxine via la dégradation des protéines IAA (qui bloquent leur action), permettent la répression transcriptionnelle du facteur de pluripotence STM (Chung et al., 2019) (**Figure 2**).

I-A-3 La transition florale : intégration de signaux environnementaux et endogènes pour la conversion du méristème végétatif en méristème inflorescentiel

Comme mentionné en début d'introduction, la vie post-embryonnaire d'*A. thaliana* est séparée en deux phases : après la phase végétative pendant laquelle la plante produit des feuilles de rosettes, l'intégration de signaux environnementaux et endogènes provoque la transition florale : les tiges s'allongent et les méristèmes végétatifs (méristème apical caulinaire et méristèmes axillaires) qui produisaient des feuilles et des branches latérales sont convertis en méristèmes d'inflorescence qui produisent eux-mêmes les méristèmes floraux, chacun à l'origine d'une fleur. La floraison est promue par plusieurs réseaux génétiques distincts, dont certains sont activés d'une façon dépendante des conditions environnementales.

Induction de la floraison par la photopériode

La plante *A. thaliana* fleurit plus vite lorsqu'elle est exposée à des jours longs qu'à des jours courts. Cette sensibilité à la photopériode lui permet, en conditions naturelles, de fleurir au printemps lorsque les jours rallongent. La perception de la photopériode au niveau des feuilles met en jeu le facteur de transcription CONSTANS (CO), dont l'accumulation, régulée à la fois au niveau transcriptionnel et post-traductionnel, dépend de la durée d'exposition à la lumière. Ainsi, à l'obscurité, le répresseur transcriptionnel CYCLING DOF FACTOR1 (CDF1) empêche la

transcription de *CO*. En jours longs, l'ubiquitine ligase FLAVIN KELCH F BOX 1 (FKF1), activée par la lumière bleue, forme un complexe avec GIGANTEA (GI) qui dégrade CDF1, permettant ainsi l'accumulation de transcrits *CO*. En jours courts, les pics d'accumulation de la protéine GI et celui de FKF1 ont lieu à des moments différents dans la journée, ce qui ne permet qu'une accumulation restreinte du complexe GI-FKF1 (Sawa et al., 2007). Au niveau post-traductionnel, la protéine *CO* est ubiquitinylée à l'obscurité par un complexe comprenant CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1) et SUPPRESSOR OF PHYTOCHROME A (SPA1), puis dégradée par le protéasome 26S. L'action du PHYTOCHROME A (PHYA) et du CRYPTOCHROME 2 (CRY2), respectivement activés par la lumière rouge et la lumière bleue, permettent la répression du complexe COP1-SPA1 à la lumière et donc l'accumulation de *CO* (Andrés and Coupland, 2012). *CO* s'accumule alors spécifiquement en jours longs. L'accumulation de *CO* permet l'activation de l'expression de *FLOWERING LOCUS T (FT)* dans les feuilles, qui code pour un facteur de transcription promoteur de la floraison (**Figure 3**).

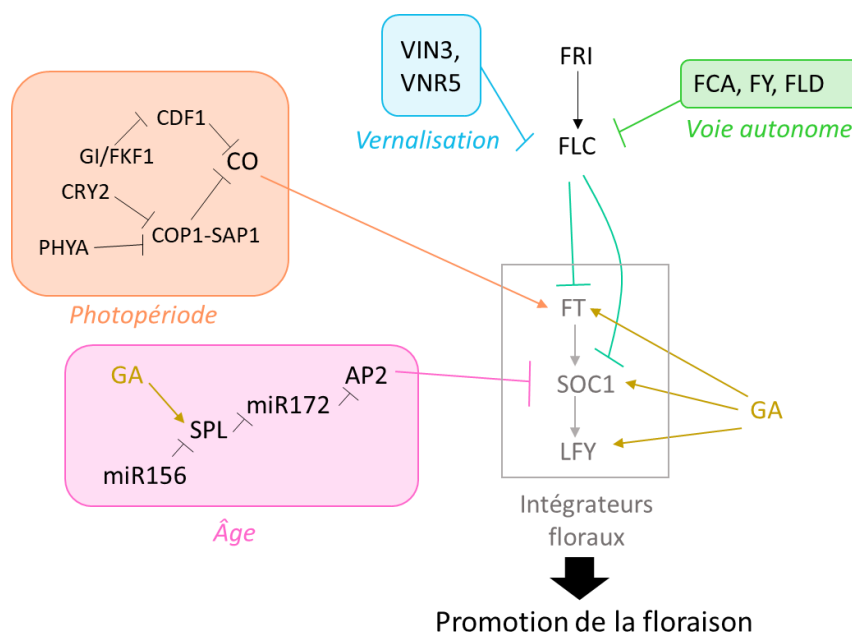


Figure 3 : Intégration des signaux de floraison par les intégrateurs floraux. Les différentes voies de régulation de la floraison (voie de la photopériode, voie de la vernalisation, voie autonome, âge de la plante et gibbérellines (GA)), dont l'activation dépend ou non des conditions environnementales, convergent vers l'activation des intégrateurs floraux. Ces derniers permettent la conversion des méristèmes végétatifs en méristèmes d'inflorescence qui produisent les fleurs. Les noms et les rôles des différents acteurs représentés sur la figure sont expliqués dans le texte du manuscrit.

Induction de la floraison par la vernalisation

Chez certains écotypes d'*A. thaliana*, la floraison n'est possible que lorsque les plantes ont été exposées à des températures froides de façon prolongée, avant de retourner à des températures plus chaudes. Ce mécanisme, appelé vernalisation, permet d'éviter une floraison prématurée qui aurait lieu avant le passage de l'hiver. La vernalisation repose sur un mécanisme de répression d'un facteur de transcription à domaine MADS, *FLOWERING LOCUS C (FLC)* au cours de l'hiver et du maintien de cette répression lors du retour aux températures chaudes.

Les écotypes pour lesquels la vernalisation est requise pour la floraison expriment des allèles fonctionnels de *FLC* et de son activateur *FRIGIDA (FRI)*. Les plantes des écotypes Columbia (Col-0) et Landsberg *erecta (Ler)*, fréquemment utilisés en laboratoire, peuvent fleurir sans vernalisation. Les allèles *FRI* de Col-0 et de Ler sont respectivement des allèles nuls et faibles (Schmalenbach et al., 2014), et l'allèle *FLC* de Ler est un allèle faible (Michaels et al., 2003). La répression de *FLC* lors de l'exposition au froid met en jeu le recrutement, au niveau de son promoteur et de son intron régulateur, de la protéine à domaine PHD VERNALIZATION INSENSITIVE 3 (VIN3), dont l'expression n'est détectée que lorsque les plantes sont exposées au froid et qui n'est pas maintenue lors d'un retour à des températures chaudes (Sung and Amasino, 2004).

Plus l'exposition au froid est prolongée, plus les niveaux d'expression de *FLC* au sein de la plante baissent. Cette intégration quantitative de la durée d'exposition au froid repose sur une inactivation digitale au niveau des cellules individuelles. Dans une cellule donnée, le locus *FLC* est soit actif, soit inactif, selon un mode tout-ou-rien. L'état inactivé de *FLC* est maintenu au cours des divisions cellulaires. Plus l'exposition au froid dure, plus la proportion de cellules dans lesquelles *FLC* est inactivé augmente et plus les niveaux globaux de *FLC* diminuent (Angel et al., 2011) (**Figure 3**).

FLC forme un complexe avec une autre protéine MADS, SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP), qui réprime deux gènes dont les produits promeuvent la floraison : le facteur de transcription à domaine MADS SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS (SOC1) et FT (Searle et al., 2006). La répression de *FLC* au cours de la vernalisation permet ainsi d'activer ces deux gènes et de conduire à la floraison (**Figure 3**).

Les voies de déclenchement de la floraison indépendantes des stimuli environnementaux

Au cours du vieillissement des plantes, la floraison peut être promue de façon indépendante de stimuli environnementaux, soit via la répression de *FLC* par d'autres voies que celle de la vernalisation, soit indépendamment de *FLC*.

La voie de répression de *FLC* indépendante de la vernalisation est appelée voie autonome. Elle met en jeu la déméthylase d'histone FLOWERING LOCUS D (FLD), ainsi que la protéine de liaison à l'ARN FCA, et le facteur FY impliqué dans la polyadénylation des ARN messagers. Les composants de cette voie permettent à l'ARN long non codant COOLAIR, transcrit depuis le brin anti-sens de *FLC*, d'être polyadénylé à un site alternatif, ce qui est requis pour la répression de *FLC* par FLD (Wu et al., 2020).

Indépendamment de *FLC*, la promotion de la floraison est couplée à l'âge des plantes : dans les feuilles juvéniles des plantes, les facteurs de transcription de la famille SQUAMOSA BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) sont réprimés par une classe de micro-ARN, les miR156. Les miRNA sont capables d'inhiber des cibles pour lesquelles ils présentent une complémentarité de séquence avec l'ARNm, en bloquant leur traduction, ou en guidant le clivage de l'ARNm, provoquant ainsi leur dégradation (Schwab et al., 2005). Au cours de la phase végétative, les niveaux d'expression de miR156 baissent, ce qui permet une accumulation des SPL dans les feuilles matures. Les SPL peuvent à leur tour activer l'expression d'un autre microARN : miR172 (Wu et al., 2009), qui réprime les gènes codant pour les facteurs de transcription de

la famille AP2. Or AP2 réprime le gène de floraison *SOC1* (Yant et al., 2010). L'expression des *SPLs* dans les feuilles âgées promeut donc indirectement la floraison (**Figure 3**).

Les gibbérellines (GA) sont des hormones qui jouent un rôle dans la promotion de la floraison (Galvão et al., 2012), indépendamment de FLC. Ces hormones fonctionnent en permettant la dégradation des protéines DELLA (Griffiths et al., 2006), qui peuvent séquestrer des facteurs de transcription. Une fois les DELLA dégradées, les facteurs de transcription ainsi libérés peuvent activer leurs cibles. Un tel mécanisme d'activation indirect par les GA a été décrit pour plusieurs gènes qui promeuvent la floraison : elles induisent l'activation de *FT* en permettant l'action de PIF4 (Kumar et al., 2012; de Lucas et al., 2008), de *SOC1* en permettant l'action des facteurs de transcription NF-Y (Hou et al., 2014), et de *LEAFY* (LFY) en permettant l'action de facteurs de transcription de type GAMYB (Gocal et al., 2001). Les GA permettent également l'action des *SPL* via la dégradation des DELLA, pour la réponse de la floraison à l'âge des plantes décrite précédemment (Yu et al., 2012) (**Figure 3**).

Intégration des signaux de floraison au niveau des méristèmes

Les différents circuits décrits précédemment convergent vers la régulation des gènes *SOC1*, *FT* et *LFY*, c'est pourquoi ces gènes sont considérés comme des intégrateurs floraux (Parcy, 2004). Tandis que *SOC1* et *LFY* sont exprimés dans les méristèmes, *FT* s'exprime dans les cellules compagnes du phloème. Il code pour une protéine qui circule dans la sève élaborée depuis les feuilles où la photopériode est perçue, jusqu'aux méristèmes qui répondent à ce signal par la conversion des méristèmes végétatifs en méristèmes inflorescentiels. *FT* est capable d'activer *SOC1*, qui est lui-même capable d'activer *LFY* (Moon et al., 2005), et ces trois intégrateurs floraux participent à l'activation de plusieurs gènes en aval qui permettent d'établir l'identité de méristème floral. *FT* peut activer directement les gènes floraux *SEPALLATA3* (*SEP3*) et *FRUITFUL* (*FUL*). *LFY* et la protéine d'identité florale *APETALA1* (*AP1*) s'activent mutuellement et activent *SEP3* et d'autres cibles, soit communes, soit spécifiques pour l'un ou pour l'autre de ces facteurs de transcription, qui sont requises pour le développement de la fleur (Liljegren et al., 1999). *LFY* peut activer les gènes floraux *APETALA3* (*AP3*) et *AGAMOUS* (*AG*) (Wu et al., 2009).

La mise en place des méristèmes floraux met en jeu un antagonisme entre les gènes d'identité florale qui s'expriment dans les ébauches florales, et les gènes d'identité inflorescentielle qui empêchent le méristème inflorescentiel d'être lui-même converti en méristème floral. Le facteur de transcription MADS *AGAMOUS-LIKE 24* (*AGL24*), qui à la fois est activé par *SOC1* et active *SOC1* (Liu et al., 2008), est exprimé spécifiquement dans le méristème d'inflorescence et réprime les gènes d'identité florale *LFY* et *AP1* (Yu et al., 2004). *TERMINAL FLOWER 1* (*TFL1*) est un gène dont la perte-de-fonction cause la conversion du méristème d'inflorescence en une fleur terminale, qui joue également un rôle dans le maintien de l'identité inflorescentielle, en empêchant l'expression de *LFY* dans le méristème d'inflorescence (Liljegren et al., 1999).

I-A-4 La morphogenèse florale : mise en place d'organes floraux aux structures et fonctions spécialisées

Les méristèmes floraux sont des structures qui dérivent d'un point de vue évolutif des méristèmes végétatifs. Ils partagent avec ces derniers un mode de fonctionnement similaire, qui repose sur l'incorporation des cellules méristématiques dans des ébauches d'organes latéraux, qui deviendront des pièces florales au lieu des feuilles. L'organogenèse florale est cependant un processus plus complexe que la génération des feuilles. Premièrement, quatre types d'organes différents sont générés dans un ordre spatial et temporel précis : quatre territoires cellulaires distincts doivent ainsi être établis. Deuxièmement, l'organogenèse s'arrête après la production du dernier verticille, qui consomme les dernières cellules souches produites par le méristème floral : contrairement aux autres méristèmes aériens, le méristème floral a une durée d'activité déterminée. Troisièmement, tandis que chez *A. thaliana*, la phyllotaxie est spiralée pour les feuilles (c'est-à-dire que les ébauches d'organes émergent les uns après les autres, avec un angle constant entre deux ébauches successives), la phyllotaxie de la fleur est verticillée : plusieurs ébauches émergent simultanément au sein d'un même verticille. Au niveau moléculaire, les méristèmes végétatif et floral sont régulés par les mêmes voies, telles que la boucle de rétro-contrôle WUS/CLV, et les voies régulatrices de STM et des cytokinines, pour le maintien de l'identité méristématique. Au sein du méristème floral, des circuits spécifiques se superposent à ces derniers, permettant l'établissement de territoires génétiquement distincts qui donneront naissance aux quatre types d'organes floraux, puis l'arrêt de l'activité méristématique coordonnée avec la génération des carpelles.

Mise en place du patron de la fleur et des identités des différents verticilles

Les gènes qui permettent de conférer des identités distinctes aux quatre verticilles de la fleur ont tout d'abord été identifiés par les transformations homéotiques observées chez les mutants perte de fonction correspondants. L'analyse des phénotypes mutants a permis l'élaboration d'un modèle génétique pour l'établissement du patron de la fleur et de l'identité de ses verticilles, appelé modèle ABC. Chez les mutants de classe A parmi lesquels *apetala1* (*ap1*) et *ap2*, les sépales sont transformés en carpelles et les pétales en étamines. Chez les mutants de classe B comme *apetala3* (*ap3*) et *pistillata* (*pi*), les pétales sont transformés en sépales et les étamines en carpelles. Enfin chez le mutant de classe C *agamous* (*ag*), une alternance de verticilles de sépales et de pétales est produite de façon indéterminée (Coen and Meyerowitz, 1991) (**Figure 4-A**).

Le modèle ABC postule que les identités des organes floraux sont conférées de façon combinatoire par les facteurs correspondant aux mutants homéotiques décrits ci-dessus. L'expression des seuls facteurs A (*AP1* et *AP2*) confère une identité de sépales ; l'expression des facteurs A combinée aux facteurs B (*AP3* et *PI*) confère une identité de pétales ; l'expression des facteurs B combinée aux facteurs C (*AG*) confère une identité d'étamines ; l'expression seule du facteur C confère une identité de carpelle. Dans ce modèle, les gènes A et C sont mutuellement antagonistes, rendant leurs domaines d'expression réciproquement exclusifs : lorsque la fonction A est manquante, l'expression des facteurs C s'étend à

l'ensemble de la fleur, et réciproquement. Le modèle ABC a ainsi permis de d'établir les fonctions nécessaires à la définition des identités d'organes dans les quatre verticilles de la fleur, et d'expliquer les phénotypes des mutants pour les différentes classes (Coen and Meyerowitz, 1991). A un niveau moléculaire, tous les gènes du modèle ABC, à l'exception d'AP2, sont des facteurs de transcription de la famille MADS, de type MIKC. Cependant, les trois fonctions A, B et C ne sont pas suffisantes pour induire une identité d'organe floral dans un tissu végétatif, indiquant la nécessité de fonctions supplémentaires. Ces fonctions n'ont été mises en évidence qu'une fois le génome d'*A. thaliana* séquencé, permettant de découvrir, par génétique inverse, les gènes redondants *SEPALLATA 1* à *4* (*SEP1* à *4*), de la même famille MADS-MIKC. Alors que les simples et doubles mutants pour ces gènes n'ont pas de phénotype floral visible, les fleurs d'un quadruple mutant *sep1 sep2 sep3 sep4* produisent des organes similaires à des feuilles à la place des sépales, pétales, étamines et carpelles (Ditta et al., 2004) (**Figure 4-A**), et l'expression ectopique combinée de AP1/AP3/PI/SEP3 est suffisante pour permettre la conversion de feuilles de rosette en organes pétaloïdes (Pelaz et al., 2001). Les *SEP* ont ainsi été regroupés dans une nouvelle classe de gènes, la classe E, pour conduire au modèle final pour les identités d'organes floraux ABCE (**Figure 4-B**).

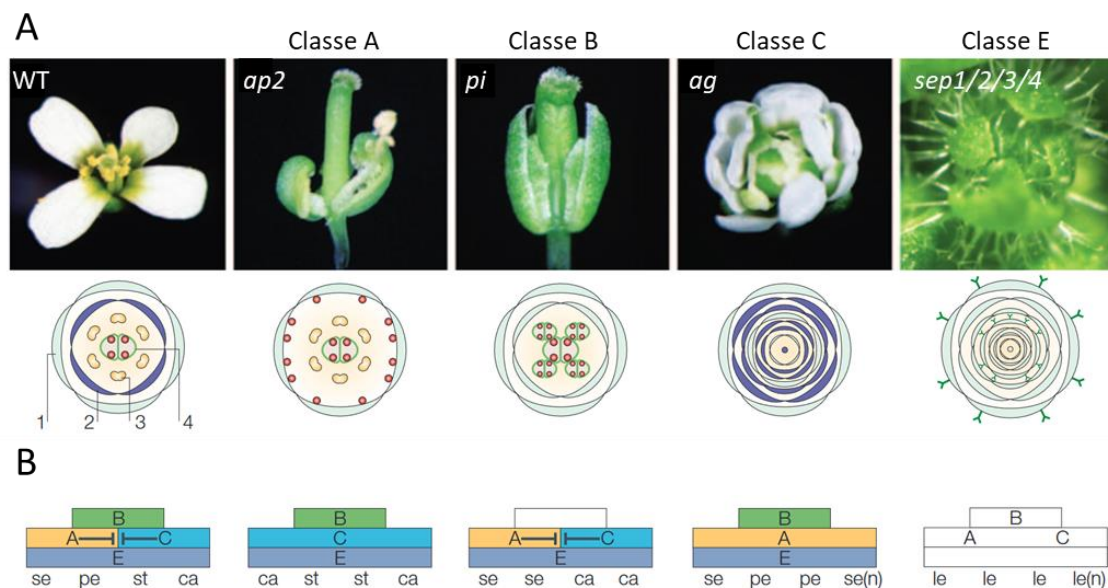


Figure 4: Modèle ABCE pour le patron de la fleur. (A) : phénotypes des mutants pour les gènes de classe A, B, C et E, et diagrammes floraux décrivant les transformations homéotiques observées chez ces mutants. (B) : explication des phénotypes mutants par le modèle ABCE. Adapté depuis (Krizek and Fletcher, 2005).

Le modèle du quartet floral, selon lequel les MADS du modèle ABCE agissent sur l'expression génique en s'assemblant sous forme de complexes tétramériques de compositions différentes dans chacun des quatre verticilles, a été proposé par (Theißen and Saedler, 2001), puis les interactions entre MADS supposées par le modèle ont été confirmées *in vivo* (Smaczniak et al., 2012). Ainsi, un tétramère formé par AP1/AP1/SEP4/SEP4 confère une identité de sépale, un tétramère AP3/PI/AP1/SEP une identité de pétale, un tétramère AG/AP3/PI/SEP une

identité d'étamine et un tétramère AG/AG/SEP/SEP confère une identité de carpelle (**Figure 5**).

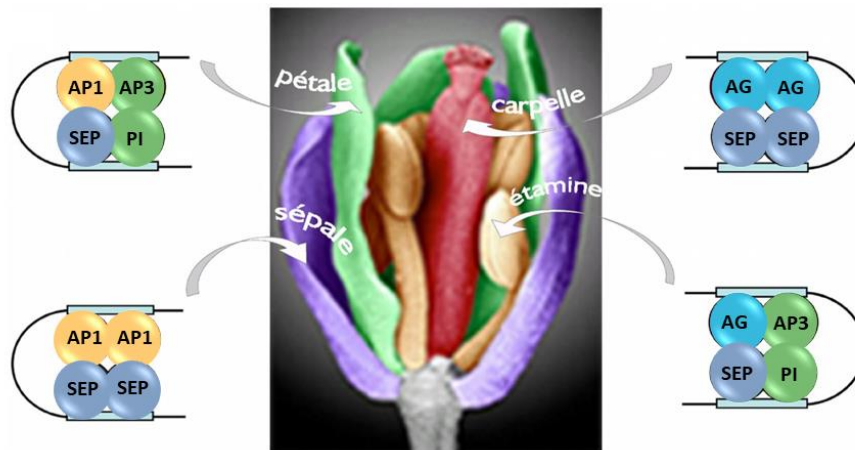


Figure 5 : Modèle du quartet floral. L'association de facteurs de transcription de la famille MADS appartenant aux classes A, B, C et E en tétramères permet la spécification des quatre types d'organes floraux. L'association des facteurs de classe A et E confère une identité de sépale. L'association des facteurs de classe A, B et E confère une identité de pétale. L'association des facteurs de classe B, C et E confère une identité d'étamine. Enfin, l'association de facteurs de classes C et E confère une identité de carpelle.

AP1 joue un rôle dual dans le développement de la fleur : dans un premier temps, il est exprimé dans l'ensemble du méristème floral pour lui conférer son identité ; après le stade 3 du développement floral, son expression est restreinte au verticille le plus externe et il joue un rôle dans l'acquisition de l'identité sépale (Mandel et al., 1992). Les bases moléculaires de l'antagonisme entre les gènes de classe A et C sont partiellement élucidées. AP1/SEP3 peut réprimer AG en recrutant le complexe répresseur composé des protéines LEUNING (LUG) et SEUSS (SEU) au niveau du premier intron régulateur d'AG (Sridhar et al., 2006). AP2 peut réprimer AG (mais également AP3 et SEP3) en recrutant le co-répresseur TOPLESS (TPL) et la déacétylase d'histone 19 (HDA19) au niveau du même intron régulateur (Krogan et al., 2012).

La restriction de la fonction AP2 aux deux verticilles externes, quant à elle, repose sur l'expression du micro-ARN (miRNA) miR172 au centre de la fleur (Chen, 2004). De plus, AP2 réprime son propre répresseur miR172 via le recrutement de LUG/SEU à sa cible (Grigoroza et al., 2011), ce qui permet la stabilisation de deux territoires d'expression distincts.

Contrôle du déterminisme floral

Au sein de la fleur, l'épuisement des cellules souches est associé à la perte d'expression de *WUS* au centre de la fleur pendant le stade 6 du développement floral, ce qui coïncide avec la production des ébauches de carpelles (Sun et al., 2019).

Cette perte d'expression de *WUS* met en jeu une boucle de rétrocontrôle négatif par AG : dans le méristème floral, *WUS* active l'expression d'AG en coopération avec LFY par une liaison à son promoteur (Lohmann et al., 2001). AG peut en retour réprimer *WUS* (Liu et al., 2011), par la formation d'une boucle chromatinienne qui inhibe le recrutement de la RNA Pol II, entre ses deux sites de liaison situés en 5' et 3' du *locus WUS* (Guo et al., 2018).

AG joue également un rôle indirect dans la répression de *WUS*, via l'activation du gène *KNUCKLES (KNU)* à partir du stade 6 du développement de la fleur (Sun et al., 2014), et *KNU* réprime en retour *WUS* (Sun et al., 2019) (**Figure 6**).

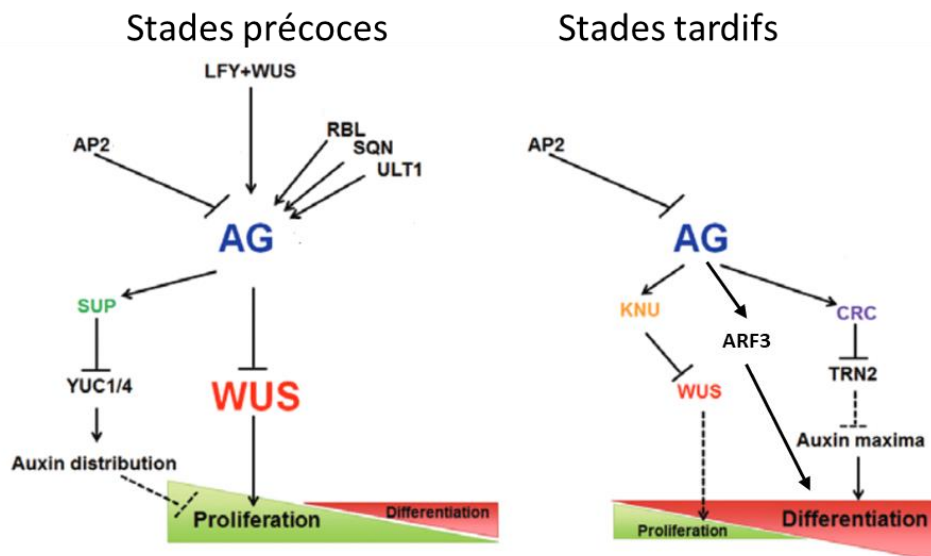


Figure 6 : Contrôle génétique et hormonal du déterminisme floral. Adapté de (Xu et al., 2019). Les noms et les rôles des différents acteurs représentés sur la figure sont expliqués dans le texte du manuscrit.

Les mutants forts *clv*, pour lesquels les méristèmes floraux sont élargis, présentent à la fois davantage d'organes dans chaque verticille et des verticilles supplémentaires à l'intérieur des carpelles (Clark et al., 1997). Au sein de ces méristèmes floraux, on observe à la fois un élargissement du domaine d'expression du *WUS* qui permettrait la production de davantage de cellules que dans les méristèmes sauvages puis l'incorporation de ces dernières dans les organes surnuméraires des verticilles, et une persistance de l'expression de *WUS* lors des stades floraux tardifs qui serait la cause de l'indéterminisme floral (Schoof et al., 2000). L'indéterminisme floral des mutants forts *clv* est donc couplé à une production d'organes floraux surnuméraires. Ce n'est pas le cas des mutants *ag* qui présentent un indéterminisme floral sans que ni les méristèmes ni le domaine d'expression de *WUS* soient élargis (Uemura et al., 2018), et sans que le nombre d'organes produits dans chaque verticille ne soit augmenté (Lohmann et al., 2001). Dans les fleurs indéterminées *ag*, la production de verticilles surnuméraires peut être expliquée par l'expression résiduelle de *WUS* au cœur du bouton floral, dans un groupe de cellules proliférant entre les deux ébauches de carpelles (Lenhard et al., 2002).

La perte-de-fonction du facteur de transcription C2H2 SUPERMAN (SUP), qui est normalement exprimé à la frontière entre le troisième et le quatrième verticille, cause un indéterminisme floral et une production d'étamines surnuméraires au détriment des carpelles (Bowman et al., 1992). SUP agirait en parallèle d'AG et de *CLV3*, puisque la mutation *sup* aggrave les phénotypes *ag clv3* (Uemura et al., 2018).

La terminaison florale est un processus auquel contribuent de nombreuses voies redondantes, certaines impliquées dans l'activation d'AG, d'autres pas : plusieurs facteurs qui promeuvent

la terminaison florale ont ainsi été identifiés par le fait que leur perte de fonction aggrave les défauts d'indéterminisme d'autres mutants. C'est le cas de *CRABS CLAW (CRC)*, un facteur MADS dont l'expression génique est activée par AG. Les fleurs des simples mutants *crc* sont correctement déterminées, mais la mutation *crc* aggrave l'indéterminisme floral des mutants *knu*. Des pertes de fonction pour les facteurs REBELOTTE (RBL), SQUINT (SQN) et ULTRAPETALA1 (ULT1) aggravent l'effet de *crc* sur l'indéterminisme floral (Prunet et al., 2008) (**Figure 6**). Le gène *AP2*, qui joue un rôle dans la maintenance des méristèmes en interagissant avec la boucle WUS-CLV en parallèle de son rôle dans l'établissement du patron floral (Würschum et al., 2006), est également impliqué dans la terminaison florale. Une version transgénique d'*AP2* résistante à la régulation par miR172 cause une expression prolongée de *WUS* dans le méristème floral et un indéterminisme (Zhao et al., 2007). Un mutant *ap2* a été identifié lors d'un crible par mutagenèse sur des plantes portant un allèle faible d'*ag* : il supprime les défauts d'indéterminisme floral de ces plantes, sans que les niveaux d'expression d'*AG* au centre de la fleur ne soient altérés. Ceci indique qu'*AP2* antagonise le déterminisme floral en réprimant *KNU*, tandis qu'*AG* active *KNU* indépendamment d'*AP2* (Huang et al., 2017) (**Figure 6**).

La terminaison du méristème met aussi en jeu un contrôle hormonal. Le facteur de réponse à l'auxine ARF3, connu pour être impliqué dans l'établissement des ébauches d'organes, est activé par AG et par l'auxine dans les fleurs de stades 5-6. En retour, ARF3 réprime les gènes de synthèse des cytokinines de la famille IPT et le récepteur des cytokinines AHK4. Cette perte du signal CK est associée à une perte des cellules souches et de l'expression de *WUS*. L'antagonisme entre auxine et CK est donc conservé pour le processus de déterminisme floral (Zhang et al., 2018).

SUP est impliqué dans la régulation de l'auxine au sein du méristème floral : il réprime directement les gènes de synthèse de l'auxine *YUCCA1* et *4 (YUC1/4)* dans les domaines du méristème où il est exprimé. La perte de cette répression chez les mutants *sup* cause une accumulation excessive de cellules et la production d'un méristème élargi dans lequel l'expression de *WUS* est maintenue au-delà du stade 6 (Xu et al., 2018b). Enfin, le mécanisme par lequel CRC contribue au déterminisme floral passe par la répression du transporteur d'auxine polarisé TORNADO2 (TRN2). En effet, la mutation *trn2* sauve les phénotypes *crc*, et une surexpression de *TRN2* sous le contrôle du promoteur *CRC* récapitule des phénotypes *crc*. CRC permettrait ainsi d'établir des maxima d'auxine correctement positionnés au sein du méristème floral, qui seraient requis pour la terminaison florale (Yamaguchi et al., 2017) (**Figure 6**).

Développement du gynécée

Après la mise en place des deux carpelles, ces derniers fusionnent et la formation du pistil se poursuit par la différenciation de tissus complexes à l'intérieur du tube formé par les carpelles fusionnés : placenta, ovule, tract de transmission, tissus stigmatiques et replum. L'identité de ces tissus internes aux carpelles met en jeu l'activation de gènes homéotiques spécifiques, qui sont également des facteurs de transcription MADS de type MIKC : *SHATTERPOOF 1* et *2 (SHP1/2)* et *SEEDSTICIK (STK)*. En effet, les triples mutants *shp1 shp2 stk* produisent des structures carpelloïdes à l'endroit où devraient émerger les ovules (Pinyopich et al., 2003). La

classe D, regroupant ces gènes d'identité de l'ovule, a ainsi été définie comme un degré de complexité supplémentaire au modèle ABC (la classe E qui regroupe les protéines SEP1/2/3/4 ayant été historiquement découverte après la classe D).

Les tissus internes au pistil émergent de tissus méristématiques qui s'établissent au niveau de la zone de fusion entre les carpelles, appelée méristème de la marge du carpelle (Carpel Meristem Margin, CMM en anglais) (Bowman et al., 1999) (**Figure 7-A**). Son fonctionnement présente des similitudes avec celui des méristèmes apicaux et met en jeu des acteurs moléculaires communs (Reyes-Olalde and de Folter, 2019). Le caractère méristématique des cellules du CMM est ainsi lié à l'expression de *STM* (Long et al., 1996). Comme dans les méristèmes apicaux, les récepteurs *CLV1/CLV2/CRN* permettent de restreindre la prolifération cellulaire (Durbak and Tax, 2011) : contrairement à ce qui se passe chez les mutants forts pour cette voie, chez les mutants faibles, le nombre de pétales, sépales et étamines, ainsi que la taille des méristèmes floraux et inflorescentiels sont normaux, tandis que le gynécée présente chez ces mutants des valves surnuméraires. Ces valves surnuméraires ne sont pas issues de la fusion de carpelles surnuméraires qui auraient été produits par le méristèmes floral, mais de la présence de CMM surnuméraires à l'intérieur des carpelles fusionnés. Le gène *KNOX1 BP/KNAT1*, exprimé dans le replum, antagonise *AS1* exprimé dans les valves, ce qui est analogue à l'antagonisme *BP/AS1* observé entre le méristème apical et les feuilles (Alonso-Cantabrana et al., 2007). L'antagonisme entre les cytokinines, qui promeuvent le maintien d'une activité méristématique, et l'auxine, qui promeut la différenciation, est également présent au sein du CMM (Reyes-Olalde and de Folter, 2019). Contrairement aux méristèmes apicaux, le fonctionnement du CMM ne met pas en jeu *WUS*, qui est réactivé plus tardivement dans les ovules, et à ce jour aucun centre organisateur qui permettrait le maintien de l'identité des cellules souches au sein du CMM n'a été découvert (**Figure 7-B**).

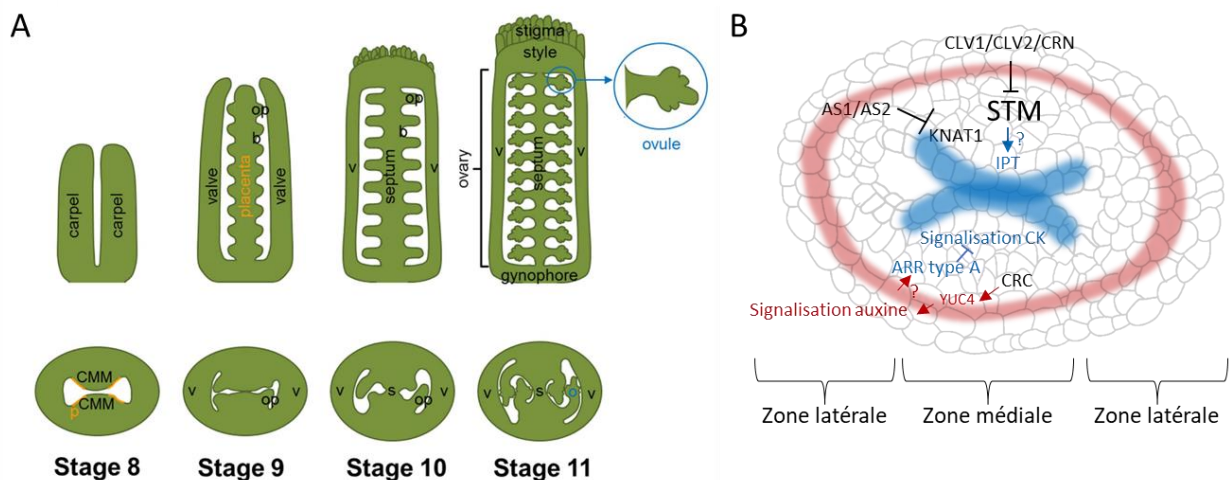


Figure 7 : Développement des structures internes du gynécée. (A) : schéma représentant des coupes longitudinales et transversales de carpelles au cours des différents stades du développement floral. CMM, carpel margin meristem; v, valve ; p, placenta ; b, boundary ; op, primordium d'ovule ; s, septum. Adapté de (Cucinotta et al., 2014). (B) : régulation génétique et hormonale du CMM. Adapté de (Reyes-Olalde and de Folter, 2019). Les noms et les rôles des différents acteurs représentés sur la figure sont expliqués dans le texte du manuscrit.

Les différentes étapes du développement des plantes décrites précédemment, homéostasie du méristème, différenciation des organes latéraux, transition florale, établissement du patron de la fleur et déterminisme floral, reposent ainsi sur des principes similaires. L'expression génique des cellules de plantes dépend en grande partie de leur position au sein de l'organisme, plus que de l'appartenance à une lignée cellulaire donnée. Les informations positionnelles que reçoivent les cellules de plante reposent sur la synthèse, le transport et la réception d'hormones et de facteurs capables de se déplacer d'une cellule à l'autre. L'équilibre entre les hormones cytokinines qui promeuvent un état méristématique et les auxines associées à la différenciation joue ainsi un rôle dans plusieurs processus développementaux différents. Les divers territoires sont établis par des jeux d'activation et de répression de facteurs de transcription architectes, parmi lesquels les facteurs de transcription à domaine MADS, qui sont évolutivement issus de duplications d'un gène ancestral unique, et qui jouent un rôle prépondérant (Gramzow and Theissen, 2010). Un gène développemental donné est souvent associé à plusieurs fonctions développementales, c'est le cas par exemple d'AP1 qui est impliqué à la fois dans l'établissement de l'identité florale et de la spécification des pétales, ou de CRC qui est impliqué à la fois dans le déterminisme floral et dans la morphogénèse des carpelles.

I-B L'expression génétique est contrôlée au niveau de la chromatine

Nous avons vu dans la partie précédente que le déroulement des programmes de développement met en jeu l'activation et la répression de facteurs de transcription dans les contextes appropriés. Le fait que les programmes génétiques soient maintenus au cours des divisions cellulaires, ou au contraire modifiés, est lié aux dynamiques qui prennent place dans les régions chromatiniennes associées aux gènes. Pour qu'un gène soit actif, c'est-à-dire transcrit, la machinerie transcriptionnelle doit pouvoir être recrutée au *locus* correspondant. A l'intérieur des cellules, la fibre d'ADN est enroulée autour d'un cœur protéique, l'ensemble constituant l'unité de base de la chromatine : le nucléosome. La chromatine forme ainsi une structure en collier de perles où alternent les nucléosomes, séparés par des séquences d'ADN « linker ». Le cœur protéique des nucléosomes est un octamère de protéines histones, composé de deux histones H3, deux histones H4, deux histones H2A et deux histones H2B (Luger et al., 1997) (**Figure 8**). Les nucléosomes forment une barrière qui limite l'accès à l'ADN pour la machinerie de transcription et les facteurs régulateurs. L'histone « linker » H1, quant à elle, permet la formation de structures compactes d'ordre supérieur et de l'hétérochromatine, mais joue également un rôle dans la structure de l'euchromatine (Rutowicz et al., 2019).



Figure 8 : Structure cristallographique d'un nucléosome. Les histones H3 sont représentées en bleu, les histones H4 en vert, les histones H2A en jaune et H2B en rouge. Les queues N-terminales des histones, soumises à des modifications post-traductionnelles, sont indiquées par les flèches. Adapté de (Luger et al., 1997)

Les interactions entre les histones et l'ADN sont dynamiques : de nouvelles histones peuvent être incorporées par des protéines chaperon, à la fois pendant la réplication de l'ADN et indépendamment de celle-ci, et les nucléosomes peuvent être déplacés ou évincés par l'action de remodeleurs chromatiniens.

Les histones sont composées d'une partie globulaire basique autour de laquelle s'enroule l'ADN, et d'une queue N-terminale ou C-terminale non structurée (**Figure 8**). Les queues d'histones sont soumises à des modifications post-traductionnelles, parmi lesquelles la méthylation (Hu and Du, 2022), l'acétylation et l'ubiquitinylation, dont la nature et la position corrént avec l'état transcriptionnel des gènes associés. Ces marques post-traductionnelles peuvent être ajoutées par des enzymes (« écrivains »), retirées par d'autres enzymes (« effaceurs ») et reconnues par des « lecteurs ». Certaines de ces modifications sont transmissibles à la descendance au cours des mitoses : on peut alors parler de marques épigénétiques, c'est-à-dire qu'elles sont porteuses d'une information héritable dont le support n'est pas la séquence d'ADN elle-même. La partie qui suit s'intéressera aux acteurs de la régulation génétique à un niveau chromatinien et à leurs effets sur le développement de la plante. Le terme « modifieur chromatinien » sera utilisé dans un sens qui regroupe les enzymes qui modifient post-traductionnellement les queues d'histone, et qui exclut les remodeleurs, et l'expression « effecteur chromatinien » sera utilisée pour désigner les modifieurs et les remodeleurs dans leur ensemble.

I-B-1 Historique de la découverte des groupes Polycomb et Trithorax, répresseurs et activateurs chromatiniens des gènes homéotiques

De nombreux effecteurs chromatiniens ont été initialement découverts par des approches génétiques dans le cadre du développement de la drosophile. Les protéines dont la perte de fonction causait des défauts homéotiques, liés à une expression ectopique des gènes *Hox*, ont été classés dans le groupe Polycomb (PcG). Les gènes pour lesquels les mutations sauvaient les phénotypes des mutants PcG ont été classés dans la catégorie Trithorax (TrxG). Il a ensuite été démontré que les protéines PcG et TrxG formaient plusieurs complexes multiprotéiques différents qui pouvaient catalyser des modifications post-traductionnelles d'histones : dépôt des marques répressives comme la triméthylation de la Lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) et l'ubiquitinylation de l'histone H2A (H2Aub) par les complexes Polycomb PRC2 et PRC1 respectivement ; dépôt des marques activatrices H3K4me3 et H3K36me3 par les complexes Trithorax. De nouvelles protéines ont pu être classifiées dans les groupes PcG et TrxG par leur appartenance à ces complexes multiprotéiques (Grimaud et al., 2006). Il n'existe pas aujourd'hui de consensus concernant la définition des groupes Trithorax : ainsi, certains auteurs proposent de limiter la définition aux protéines appartenant aux complexes qui déposent les marques activatrices H3K4me3 et H3K36me2/3, et d'en exclure les remodeleurs de la chromatine, dont la fonction activatrice sur les gènes joue des rôles plus larges que contrecarrer l'activité PcG sur les gènes homéotiques (Grimaud et al., 2006) ; tandis que d'autres incluent les complexes remodeleurs dans la catégorie TrxG (Schuettengruber et al., 2017).

I-B-2 Des combinaisons variées de marques histones forment un nombre limité d'états chromatiniens.

Une grande variété de marques histones peuvent être détectées chez les végétaux : plusieurs acides aminés différents présents sur les queues d'histones, en particulier la queue N-terminale, peuvent être modifiés par l'ajout post-traductionnel de différents groupements

chimiques. Par exemple, les lysines peuvent être soit acétylées, soit mono-, di- ou triméthylées. Des études portant sur la répartition de plusieurs modifications d'histones à l'échelle du génome, et la colocalisation de plusieurs types de marques, ont cependant montré que l'on pouvait définir un nombre restreint d'états chromatinien (« chromatin states » en anglais, ou CS) au sein du génome, chacun caractérisé par la combinaison de plusieurs marques (Roudier et al., 2011; Sequeira-Mendes et al., 2014). Quatre états chromatinien ont été définis par (Roudier et al., 2011) (**Figure 9**) : L'état CS1, associé aux marques H3K4me2/3, H3K36me3 et H3K56me3, co-localise avec les gènes transcriptionnellement actifs. L'état CS2, associé aux marques H3K27me2 et me3, co-localise avec les gènes inactifs. L'état CS3, associé aux marques H3K9me2, H3K27me1/2, H4K20me1 et à la méthylation de l'ADN, co-localise avec les transposons. L'état CS4, qui ne présente pas d'enrichissement particulier pour aucune des 12 marques testées, est sur-représenté au niveau des régions intergéniques. Neuf états chromatinien ont été définis par (Sequeira-Mendes et al., 2014), dont plusieurs correspondent à un état répressif : dans cette études, l'état 9 qui correspond à une répression Polycomb classique a par exemple été séparé de l'état 2, qui correspond à une structure chromatinienne spécifique des promoteurs des gènes soumis à une répression Polycomb.

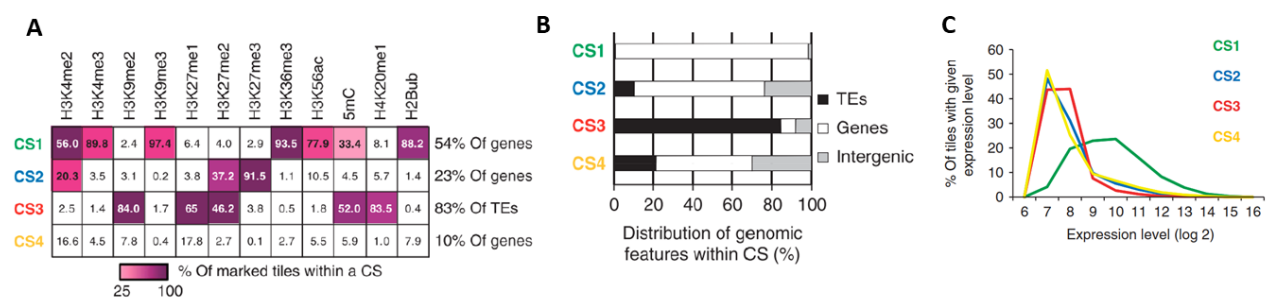


Figure 9 : Les quatre états chromatinien prédominants de l'épigénome d'*A. thaliana*. (A) : Distribution des 12 marques épigénétiques testées par (Roudier et al., 2011) pour les quatre états chromatinien définis. Les pourcentages indiqués correspondent à la proportion des régions assignées l'état chromatinien considéré qui portent la marque considérée. (B) : distribution des différents éléments génomiques pour chacun des quatre états chromatinien. Tandis que l'état CS1 est principalement retrouvé sur des séquences codant pour des gènes, l'état CS3 correspond principalement à des transposons. (C) : relations entre les 4 états chromatinien et les niveaux d'expression des gènes. Adapté de (Roudier et al., 2011).

Le fait que des modifications différentes soient associées d'une part aux gènes et d'autre part aux transposons confirme le fait que gènes et transposons sont réprimés via des mécanismes différents chez *A. thaliana*. Nous nous intéresserons par la suite uniquement à certaines modifications chromatinien, en particulier celles qui jouent un rôle la régulation de l'expression des gènes.

I-B-3 L'ajout et le retrait de marques épigénétiques, catalysés par des enzymes, permet les reprogrammations transcriptionnelles qui ont lieu au cours du développement

Méthylation de l'ADN

L'ADN des plantes peut être méthylé au niveau des cytosines, selon trois contextes différents : CG, CHG et CHH, H représentant n'importe quel nucléotide autre que G. Les méthylations dans

ces trois contextes sont permises par trois familles d'enzymes différentes : MET1, CMT et DRM, respectivement. La majorité de ces marques est portée par des transposons et est associée à leur répression. Les mécanismes de méthylation passent par l'action de siARN, qui sont produits par les ARN Pol IV et V. Après avoir été produits et chargés sur des protéines AGO, ces siARN pourront diriger la méthylation vers les séquences d'ADN qui leur sont complémentaires. On trouve également de la méthylation dans le contexte CG dans le corps de gènes transcriptionnellement actifs (Law and Jacobsen, 2010), dont la fonction dans le contrôle de l'expression génique reste à élucider. La marque histone répressive H3K9me₂, déposée par la méthyltransférase KRYPTONITE/SUVH4 (KYP) joue un rôle dans la maintenance de la méthylation en contexte CHG. En effet ces deux marques colocalisent, et la perte de la marque H3K9me₂ chez les mutants perte-de-fonction *kyp* cause une perte de méthylation CHG à l'ADN des cibles, et leur réactivation (Liu et al., 2010).

Acétylation des histones

Les lysines des histones peuvent être acétylées. L'acétylation des histones neutralise les charges positives portées par les nucléosomes, ce qui a pour conséquence le relâchement de la chromatine, causant ainsi une augmentation de l'accessibilité à l'ADN. Ce relâchement s'illustre par une augmentation de l'accessibilité de pour DNase1 (Eberharter and Becker, 2002), et corrèle généralement avec une activation de la transcription. C'est donc une marque dont l'influence sur la transcription peut s'expliquer directement par une altération des propriétés physico-chimiques des histones, sans qu'il ne soit nécessaire de recruter des lecteurs. De nombreux résidus différents peuvent être acétylés sur les queues d'histones : H3K9, H3K14, H3K27, H3K36, H4K5, H4K8, H4K12 et H4K16. Chez *A. thaliana*, l'acétylation des histones est catalysée par 12 enzymes différentes appelées HISTONE ACETYLASES (HAT). Ces HAT peuvent être classées en 4 familles par homologie de séquences : familles GNNAT, MYST, CBP et TAFII250 (Pandey et al., 2002). La désacétylation est quant à elle catalysée par 18 désacétylases d'histones (HDAC) regroupées en 4 familles : RPD3, HDA1, SIR2 et HD2 (Pandey et al., 2002) (**Figure 10**). Plusieurs étapes du développement des plantes mettent en jeu la répression de gènes par un complexe répresseur composé d'une HDAC associée à un facteur de transcription : c'est le cas de la répression des gènes *KNOX* au cours de la différenciation des feuilles par un complexe HDA6-AS1 (Luo et al., 2012), et de la répression d'*AG* par un complexe HDA19-AP2 lors de la mise en place du patron de la fleur (Krogan et al., 2012).

Marques activatrices H3K4me₃ et H3K36me_{2/3}

Des expériences de CHIP-on-chip ont montré que les marques H3K4me₂ et me₃ sont situées exclusivement au niveau de gènes, qu'elles sont enrichies dans les promoteurs et la partie 5' de ces derniers, et qu'elles sont associées à une expression active (Zhang et al., 2009). Les marques portées par la Lysine H3K4 peuvent être ajoutées par les protéines ARABIDOPSIS TRIHORAX 1 à 5 (ATX1-5) et ATX-RELATED 3/7 (ATXR3/7) (Foroozani et al., 2021) (**Figure 10**). Certaines de ces enzymes, comme ATX1, catalysent la triméthylation en position H3K4, tandis que d'autres comme ATX2 catalysent la diméthylation (Saleh et al., 2008). Ces enzymes sont intégrées au sein de complexes multiprotéiques, les complexes COMPASS-like (Cenik and Shilatifard, 2021) et peuvent contribuer à la transcription de gènes par des activités

dépendantes et indépendantes de la méthylation H3K4me3 : il a été montré qu'ATX1 jouait à la fois un rôle dans le recrutement de la TATA BINDING PROTEIN (TBP) et de la RNAPol II lors de la formation du complexe de pré-initiation (PIC), indépendamment de son activité catalytique méthyltransférase, et un rôle dans la promotion de l'élongation transcriptionnelle qui dépendrait des marques H3K4me3 (Ding et al., 2011, 2012).

La déméthylation active en position H3K4 est catalysée par des enzymes appartenant à deux familles différentes présentant chacune un mécanisme catalytique distinct. D'une part, la famille LSD1 présente quatre homologues chez *A. thaliana* : FLOWERING LOCUS D (FLD) et LSD-LIKE 1/2/3 (LDL1/2/3) (Jiang et al., 2007)). FLD est impliquée dans la répression de *FLC* pour promouvoir la floraison. D'autre part, parmi les 21 membres de la famille JUMONJI, qui codent pour des déméthylases d'histones dont la spécificité varie d'un membre à un autre (Lu et al., 2008), les protéines JUMONJI14 à 18 (JMJ14 à 18) ont une spécificité pour H3K4me3 (Foroozani et al., 2021) (**Figure 10**). Ces quatre homologues diffèrent dans leurs patrons d'expression, leurs gènes cibles et les processus qu'ils régulent : ainsi JMJ18 est impliquée dans la régulation de la floraison via la répression de *FLC* dans les cellules compagnes du phloème (Yang et al., 2012), tandis que JMJ16 est impliquée dans la répression des gènes liées à la sénescence des feuilles (Liu et al., 2019).

Chez les plantes, la marque H3K36me3 est enrichie dans la partie 5' des gènes et la marque H3K36me2 dans la partie 3' (Leng et al., 2020). Ces marques sont associées à une transcription active (Xu et al., 2008). Elles peuvent être déposées par quatre enzymes différentes : SDG4, SDG8, SDG26 et ATXR4/SDG36 (Xiao et al., 2016). SDG8 interagit physiquement avec la machinerie transcriptionnelle, indiquant que le dépôt des marques de méthylation sur H3K36 pourrait être couplé à la transcription (Yang et al., 2016). Tandis que chez les animaux, la marque H3K36me3 est déméthylée par une sous-famille de protéines JMJ, les enzymes qui déméthylent cette marque sont encore inconnues chez les végétaux. Cependant un tel rôle a été suggéré pour INCURVATA11 (ICU11) car les niveaux globaux d'H3K36me3 sont augmentés chez les mutants *icu11* (Bloomer et al., 2020) (**Figure 10**).

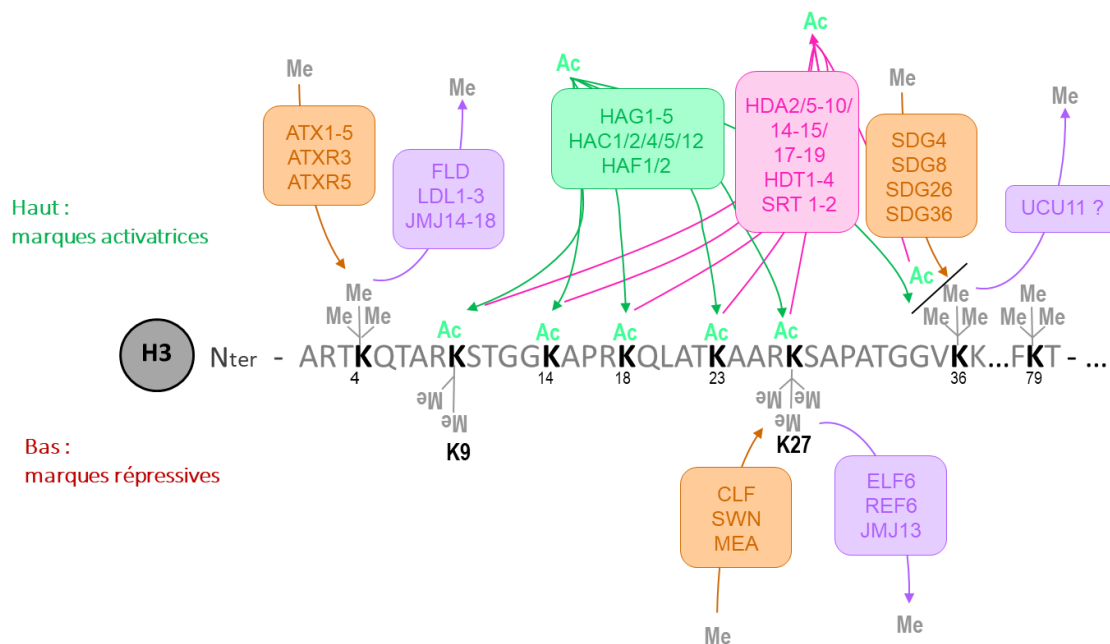


Figure 10 : Modifications post-traductionnelles des Lysines de la queue N-Terminale de l'histone H3.

Les noms des méthyltransférases sont écrits en orange, ceux des déméthylases en violet, ceux des acétyltransférases en vert et ceux des déacétylases en rose. Les lysines 9, 27 et 36 peuvent être soit méthylées soit acétylées, ces deux modifications étant mutuellement exclusives. Les noms et les rôles des différents acteurs représentés sur la figure sont expliqués dans le texte du manuscrit.

Marques répressives H3K27me3, H2AUb, et protéines accessoires des complexes PcG

Les marques répressives H3K27me3 et H2AUb sont déposées respectivement par les complexes PRC2 et PRC1. Ces deux complexes peuvent fonctionner soit indépendamment l'un de l'autre soit de manière coopérative, et s'associent tous les deux avec des protéines accessoires qui jouent un rôle dans la répression que ces complexes médient (Baile et al., 2021a).

Dépôt de la marque répressive H3K27me3 par le complexe PRC2

La marque H3K27me3 est catalysée par le complexe PRC2. Le complexe PRC2, conservé chez les eucaryotes, est composé de quatre sous-unités qui interagissent physiquement entre elles. Chez la levure, ces protéines sont Enhancer of Zeste [E(Z)] qui porte le domaine SET catalysant l'ajout de la marque de triméthylation, Suppressor of Zeste 12 [Su(Z)12] qui porte un domaine VEFs, et les protéines à domaines WD40 p55 et extra sex combs (esc) (Mozgova and Hennig, 2015). Chez *A. thaliana*, il existe trois homologues d'E(z) : CURLY LEAF (CLF), SWINGER (SWN) et MEDEA (MEA); trois homologues de Su(Z)12 : EMBRYONIC FLOWER 2 (EMF2) et VERNALIZATION INSENSITIVE 2 (VRN2) et FERTILIZATION-INDEPENDENT SEED 2 (FIS2); un homologue d'esc : FERTILIZATION INDEPENDANT ENDOSPERM (FIE); et un homologue de p55 dont l'appartenance au complexe PRC2 est démontrée : MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA 1 (MSI1) (**Figure 11-A**)

Les 4 homologues de MSI1, MSI2 à 5, ne font partie ni du complexe EMF2-PRC2 ni du complexe VRN2-PRC2. Cependant MSI4 (également appelé FVE et classé dans la voie autonome du

contrôle de la floraison) et MSI5 semblent être, comme MSI1, impliqués dans des régulations chromatinienne : MSI4 se lie au *locus FLC* et est requis pour la méthylation en position H3K27 pour ce gène (Pazhouhandeh et al., 2011). MSI4 et MSI5 jouent également un rôle dans la répression des éléments transposables et des séquences répétées via la méthylation de l'ADN dirigée par des siARN (voie RdDM) (Gu et al., 2011).

Les homologues animaux de MSI1 permettent une interaction physique avec les histones. MSI1 est en fait à la fois un composant du PRC2, du complexe chaperon CAF1 impliqué dans l'incorporation des dimères H3-H4 au cours de la réplication de l'ADN, et de complexes contenant des désacétylases d'histones (Hennig et al., 2005).

MEA interagit spécifiquement avec FIS2 pour former un complexe PRC2 impliqué dans la répression du développement de l'albumen dans la graine (Chanvivattana et al., 2004). Ce complexe est spécifique aux brassicacées : on ne retrouve pas d'homologues de FIS2 ou de MEA chez d'autres espèces de plantes (Vijayanathan et al., 2022). CLF comme SWN peuvent interagir à la fois avec EMF2 et VRN2 (Chanvivattana et al., 2004). Le complexe PRC2-VRN2 joue un rôle spécifique dans la répression au *locus FLC* au cours de la vernalisation.

Les mutants *clf* présentent des feuilles recourbées vers le haut, une floraison précoce, et des fleurs avec des défauts homéotiques. Les phénotypes foliaires de *clf* sont causés par une expression ectopique d'AG : la double mutation *clf ag* supprime ce phénotype (Goodrich et al., 1997). Les plantes mutantes *swn* ne sont pas clairement distinguables des plantes sauvages, mais chez les doubles mutants *clf swn*, après un développement embryonnaire normal, des masses de tissus désorganisés ressemblant à des cals se développent. En fait, ces structures contiennent des types tissulaires aléatoires, issus de différenciations cellulaires anarchiques dues à la dé-répression ectopique des gènes développementaux. Il existe donc des fonctions spécifiques à CLF et des fonctions pour lesquelles CLF et SWN peuvent agir de façon redondante. Les expressions de *CLF* et *SWN* suivent des patrons similaires, avec un niveau fort dans les méristèmes, et plantes *clf* peuvent être sauvées par l'insertion d'un transgène *35S::CLF* mais pas par un transgène *35S::SWN* : la spécificité fonctionnelle de CLF par rapport à SWN est sans doute liée à des différences dans la nature des deux protéines. (Chanvivattana et al., 2004) (**Figure 11-B**).

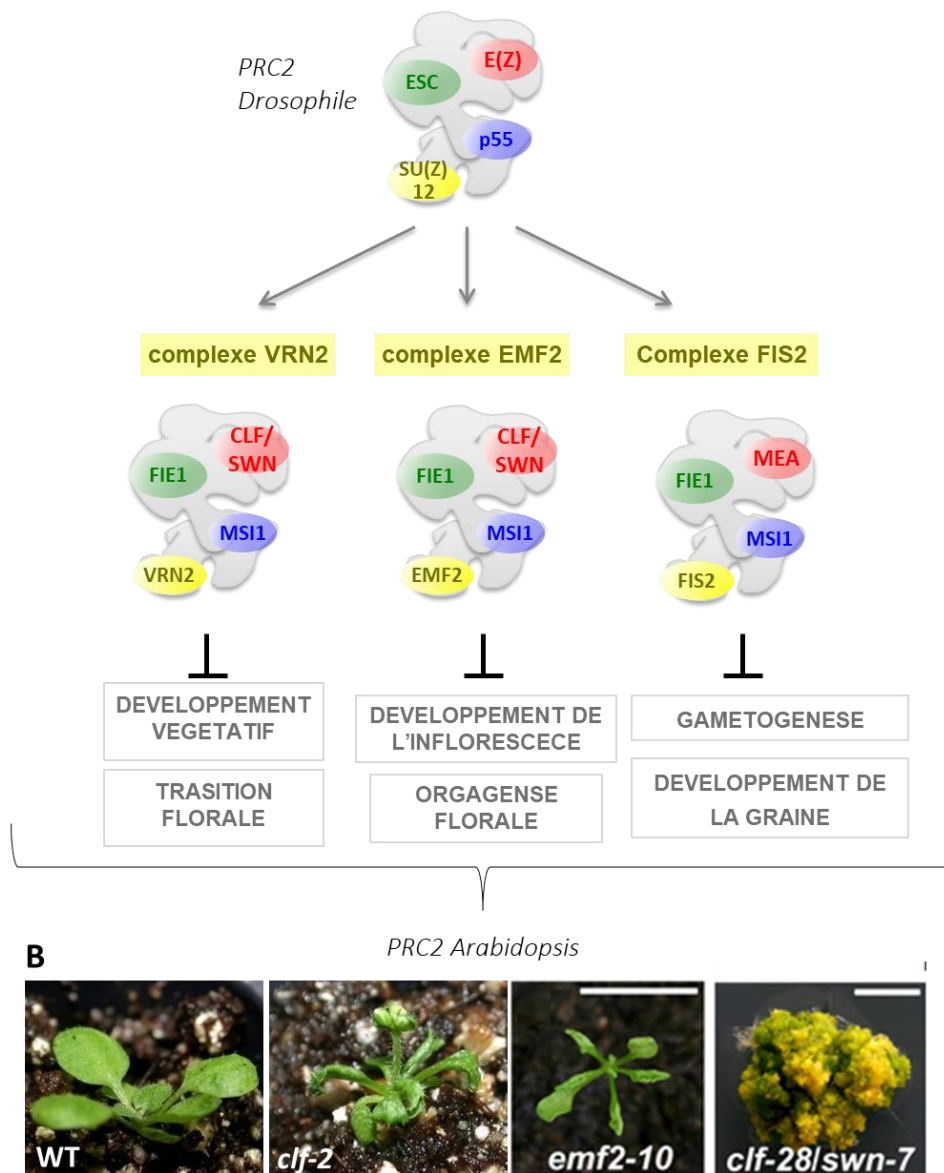


Figure 11 : Les complexes PRC2 chez *A. thaliana*. (A) Des duplications des gènes codant pour les membres du complexe PRC2 chez *A. thaliana* ont permis l'émergence de trois complexes distincts. Adapté de (Engelhorn et al., 2014). (B) Phénotypes des mutants perte-de-fonction pour différentes sous-unités du PRC2. L'allèle faible *emf2-10* provoque des phénotypes similaires à ceux de l'allèle fort *clf-2*. La double mutation *clf-28 swn-7* provoque le développement de masses tissus désorganisés, ce qui met en évidence la redondance fonctionnelle entre CLF et SWN. Photos de plantules sauvages et *clf-2* publiées dans (Carles and Fletcher, 2009) ; Photos des plantules *emf2-10* et *clf-28 swn-7* publiées dans (Lafos et al., 2011).

Il a été démontré que les homologues d'EED/FIE chez l'être humain et chez le champignon *Chaetomium thermophilum* sont capables de se lier aux nucléosomes portant la marque H3K27me3, et que la liaison de cette protéine à un peptide H3K27 provoque une activation allostérique du complexe PRC2 : l'activité catalytique du complexe est donc stimulée par son propre substrat (Bratkowski et al., 2017; Margueron et al., 2009). Cette auto-activation pourrait jouer un rôle dans le renouvellement de la marque H3K27me3 après la réplication de l'ADN : les histones parentales portant la marque H3K27me3 pourraient activer le PRC2 pour

catalyser l'ajout de celle-ci sur les histones adjacentes nouvellement incorporées à la chromatine (Hugues et al., 2020).

Dépôt de la marque répressive H2Aub par le complexe PRC1

Chez *A. thaliana*, les protéines RING1 A/B et BMI1 A/B/C ont été identifiées comme membres du complexe PRC1 par homologie de séquence avec des protéines animales (Sanchez-Pulido et al., 2008). Elles interagissent physiquement les unes avec les autres et sont toutes capables de catalyser *in vitro* l'ubiquitination de l'histone H2A (H2AK121Ub), une marque répressive dont la perte cause une dé-répression de gènes embryonnaires chez les plantules (Bratzel et al., 2010), mais également des gènes méristématiques de la famille *KNOX1* (*STM*, *BP/KNAT1*, *KNAT2* et *KNAT6*) dans les feuilles de rosette (Xu and Shen, 2008).

Le lecteur LHP1 est associé au complexe qui dépose la marque H3K27me3

LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 (LHP1) est un homologue de HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 (HP1), une protéine animale capable de reconnaître la marque hétérochromatique H3K9me3 via son chromodomaine. Cependant, contrairement à son homologue, LHP1 est lié à l'euchromatine et co-localise avec la marque H3K27me3 (Turck et al., 2007; Zhang et al., 2007). Chez les animaux, la reconnaissance de la marque H3K27me3 est assurée par le membre Pc du PRC1, qui ne possède pas d'homologue chez les végétaux. De plus, des interactions entre LHP1 et BMI ont été détectées par double hybride de levure, ce qui a conduit à proposer que LHP1 est un membre du complexe PRC1, avec une fonction analogue à celle de Pc (Xu and Shen, 2008). Cependant des expériences d'IP-MS ont depuis permis de démontrer qu'il faisait également partie du complexe PRC2 (Bloomer et al., 2020) (**Figure 12**).

LHP1 jouerait un rôle dans la propagation spatiale de la marque H3K27me3 : elle permettrait le recrutement du PRC2 au niveau nucléosomes portant cette marque répressive, ce qui conduirait à la méthylation des nucléosomes adjacents. Dans le cas de la répression de *FLC*, au cours de l'exposition des plantes au froid, la marque H3K27me3 n'est initialement présente qu'au niveau d'un site de nucléation situé au début du gène *FLC* (Yang et al., 2017). La marque H3K27me3 au niveau du site de nucléation colocalise avec la protéine à domaine PHD VERNALIZATION INSENSITIVE 3 (VIN3), qui est exprimée spécifiquement au cours de l'exposition à des températures froides (Sung and Amasino, 2004) et forme un complexe multiprotéique comprenant ses homologues VIL3-LIKE 1/VERNALIZATION INDEPENDENT 5 (VIL1/VRN5) et VIL2 et les membres du PRC2 MSI1, FIE, VRN2 et SWN (De Lucia et al., 2008). Ce n'est qu'après le retour aux températures chaudes que la marque s'étend sur l'ensemble du *locus*, ce qui est associé à une perte de VIN3 (Yang et al., 2017). Les phases de nucléation et de propagation de la marque reposent sur des composants différents : tandis que chez les mutants *vin3* et *vrn2*, la nucléation de la marque H3K27me3 ne peut s'établir lors d'une exposition au froid, cette nucléation est possible chez les mutants *clf* et *lhp1* ; chez ces derniers, en revanche, la propagation de la marque lors du retour aux températures chaudes est impacté (Costa and Dean, 2019). De plus, une étude à l'échelle du génome a montré que l'intensité du signal H3K27me3 était réduit aux alentours des pics chez les mutants *clf* et *lhp1* d'une façon globale (Wang et al., 2016) : LHP1 et CLF seraient donc requis pour la propagation

de la marque H3K27me3 à partir de sites de nucléation, une fonction pour laquelle SWN ne pourrait pas se substituer à CLF.

LHP1 joue un rôle dans la transmission des marques H3K27me3 au cours de la réplication de l'ADN, en permettant le recrutement du PRC2 par la marque portée par les histones parentales ré-incorporées après le passage de la fourche de réplication. Ceci permet la propagation de la marque aux histones nouvellement incorporées. De plus, cette protéine interagit à la fois avec le PRC2 et avec des composants de la machinerie de réplication telles que la protéine ENHANCER OF LHP1 (EOL1), ce qui permettrait de coupler l'activité du PRC2 à la réplication (Hugues et al., 2020).

Un autre rôle a été découvert pour LHP1 : cette protéine permet la formation d'une boucle chromatinienne répressive au *locus WUS*, en reliant une région située en 3' du gène et une autre située en 5'. Dans ce mécanisme, LHP1 travaille de concert avec AG qui permet son recrutement dans la région en 5' via la reconnaissance d'une CarG box (Guo et al., 2018). LHP1 induit également la formation d'une boucle chromatinienne au *locus* du transporteur d'auxine polarisé PINOID (PID). Cette boucle peut être ouverte par la transcription de l'ARN long codant APOLO, ce qui permet la dé-répression de PID en présence d'auxine (Ariel et al., 2014). Plus globalement, des expériences d'Hi-C (capture des boucles chromatiniennes sur l'ensemble du génome) ont montré que LHP1 a un effet global sur la conformation 3D du génome en formant des boucles chromatiniennes qui rapprochent physiquement des gènes co-régulés (Veluchamy et al., 2016).

Les protéines EARLY BOLTING IN SHORT DAYS (EBS) et SHORT LIFE (SHL) sont d'autres lecteurs spécifiques des marques H3K27me2 et H3K27me3. EBS et SHL interagissent avec l'ubiquitine ligase du PRC1 BMI1A et la protéine PcG accessoire EMBRYONIC FLOWER 1 (EMF1), et jouent un rôle partiellement redondant avec LHP1, puisque les pertes de marques H3K27me3 et H2Aub à l'échelle du génome sont aggravées chez le triple mutant *ebs shl lhp1* par rapport au double mutant *ebs shl* et au simple mutant *lhp1* (Li et al., 2018).

La protéine accessoire EMF1 pourrait jouer un rôle dans la compaction de l'ADN

EMF1 est requis pour la répression Polycomb au *locus AG*. Cette protéine possède une séquence peptidique désordonnée et chargée qui permettrait la compaction de l'ADN, de façon similaire à la protéine de Drosophile PCL, qui ne présente pas d'homologue chez *A. thaliana* (Beh et al., 2012; Calonje et al., 2008). Des interactions physiques *in vitro* ont été détectées entre EMF1 et les protéines RING1A/B et BMI1A/B, ce qui a conduit à classer EMF1 comme une protéine PRC1 (Bratzel et al., 2010) (**Figure 12**). Cependant des expériences d'IP-MS réalisées ultérieurement ont montré qu'EMF1 est associé au complexe PRC2 (Bloomer et al., 2020).

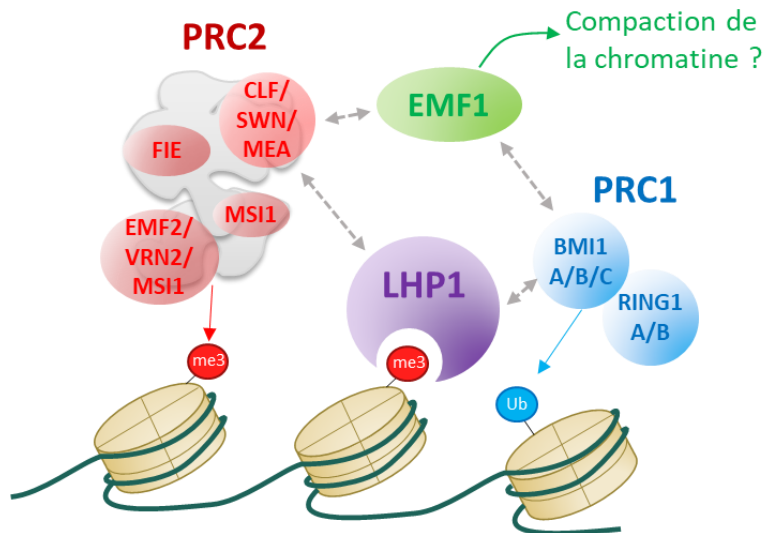


Figure 12 : Interactions entre complexes PRC1, PRC2 et protéines accessoires. Le complexe PRC2 catalyse le dépôt de la marque H3K27me3 tandis que les protéines PRC1 RING1A/B sont responsables du dépôt de la marque H2Aub. LHP1, qui reconnaît la marque H3K27me3, et EMF1 interagissent physiquement à la fois avec des membres du complexe PRC2 et du complexe PRC1 (flèches en pointillée). Les noms et les rôles des différents acteurs représentés sur la figure sont expliqués dans le texte du manuscrit.

Coopération entre les complexes PRC1 et PRC2 dans la répression des gènes

Chez les animaux, un modèle de recrutement hiérarchique a été proposé pour décrire les mécanismes de répression PcG : dans un premier temps, le PRC2 déposerait la marque H3K27me3 aux *loci* cibles. H3K27me3 serait ensuite reconnue par la sous-unité Pc du PRC1, ce qui permettrait le recrutement subséquent de ce complexe, puis la compaction de la chromatine (Wang et al., 2004).

Chez les plantes, une étude à l'échelle du génome de la répartition des marques H3K27me3 et H2Aub chez des mutants *prc1* et *prc2* a montré : (1) qu'il existait des gènes uniquement marqués par H2Aub, des gènes uniquement marqués par H3K27me3 (parmi lesquels les gènes floraux *AG*, *AP1* et *SEP2*), et des gènes qui présentaient les deux marques (parmi lesquels *SOC1* et *WUS*) ; (2) que les mutations *prc2* ne réduisaient pas les marques H2Aub, mais qu'en revanche les mutations *prc1* causaient une réduction des marques H3K27me3 pour les gènes qui portent les deux marques dans un contexte sauvage (Zhou et al., 2017a). Ainsi, contrairement au dogme initialement établi chez les animaux, la marque déposée par l'activité du PRC1 serait un prérequis pour le recrutement du PRC2 à certains *loci*, et non l'inverse.

Déméthylation active de la marque H3K27me3

Une activité déméthylase sur H3K27me3 et H3K27me2, mais pas sur H3K27me1, a été démontrée *in vitro* pour un groupe de trois protéines à domaine Jumonji (JmJ) parmi les 21 membres de cette famille chez *A. thaliana* : EARLY FLOWERING 6/JUMONJI11 (ELF6/JMJ11), RELATIVE OF EARLY FLOWERING 6 /JUMONJI12 (REF6/JMJ12) et JUMONJI13 (JM13) (Yan et al., 2018; Zheng et al., 2019). La construction d'un arbre phylogénétique entre les protéines JM1 du Riz, d'*A. thaliana* et de l'Homme montre que les homologues humains les plus proches

d'ELF6, REF6 et JMJ13, qui appartiennent à la sous-famille KDM4, déméthylent H3K9me3 et H3K36me3. La sous-famille KDM6, dont les membres déméthylent spécifiquement H3K27me3 chez l'humain, ne présente pas d'homologues chez les végétaux (Mosammaparast and Shi, 2010). La spécificité des déméthylases d'histones peut donc changer au cours de l'évolution, de la même manière que ce qui est observé pour les lecteurs de marques comme LHP1, qui reconnaît H3K27me3 tandis que son homologue animal reconnaît H3K9me3.

ELF6, REF6 et JMJ13 présentent des patrons d'expression distincts : tandis que REF6 et JMJ13 sont exprimés majoritairement dans les méristèmes caulinaires et racinaires, et dans une moindre mesure dans les racines et les nervures des feuilles, ELF6 est exprimée principalement dans les feuilles (Noh et al., 2004; Hong et al., 2009).

Les protéines ELF6, REF6 et JMJ13 portent, en plus de leur site catalytique, des domaines à doigt de Zinc de type C2H2 (pour ELF6 et REF6) ou C4HCHC (pour JMJ13), qui peuvent permettre leur recrutement via la reconnaissance directe de séquences d'ADN spécifiques (Zheng et al., 2019). Ainsi, l'activation des gènes *TCH4* et *CUC1* par REF6 via la déméthylation H3K27me3 dépend de la liaison des domaines ZnFC2H2 de REF6 à des motifs d'ADN CTCTGYT contenus dans les promoteurs de ces gènes (Cui et al., 2016). Ces déméthylases peuvent également être recrutées à des *loci* cibles via une interaction avec des facteurs de transcription : l'activation de *SOC1* par REF6 met en jeu les facteurs de transcription NF-Y qui recrutent REF6 en réponse aux gibbérellines (Hou et al., 2014).

En parallèle de leur rôle dans l'activation de cibles développementales spécifiques, les déméthylases H3K27me3 permettraient de restreindre les frontières spatiales des domaines marqués par H3K27me3, évitant ainsi leur propagation de part et d'autre des gènes ciblés par le PRC2 (Yan et al., 2018) (Crevillén, 2020). Ainsi, 87,9% des gènes qui sont décorés par la marque H3K27me3 spécifiquement chez le triple mutant *elf6 ref6 jmj1^G* se situent dans le voisinage d'une cible PRC2 « réelle » (qui porte la marque H3K27me3 dans le contexte sauvage). De plus, la construction d'un métagène à partir de résultats de ChIP-seq montre l'existence de sites de liaison de REF6 sur l'ADN de part et d'autre des sites occupés par le PRC2 (Yan et al., 2018).

I-B-4 Les remodeleurs affectent la dynamique des nucléosomes

Les remodeleurs de la chromatine sont organisés en complexes protéiques conservés chez les eucaryotes, couplant l'hydrolyse de l'ATP au déplacement ou à l'éviction des nucléosomes qui barrent l'accessibilité aux séquences cis-régulatrices. Tous les complexes remodeleurs de la chromatine contiennent une sous-unité enzymatique qui présente deux domaines ATPase permettant la translocation de l'ADN par rapport au nucléosome sur lequel le remodeleur est amarré (Clapier et al., 2017). Les remodeleurs sont classés en différentes familles en fonction des autres domaines qu'ils possèdent ; les principales familles sont les familles SWI2/SNF2, CHD, ISWI, INO80 et SWR1 (Clapier and Cairns, 2009) (**Figure 13**). Par leurs mécanismes, les remodeleurs rendent donc l'ADN accessible pour la liaison de facteurs régulateurs ou la machinerie transcriptionnelle, mais jouent également un rôle dans la restauration du positionnement des nucléosomes après le passage de la fourche de réplication, et dans l'incorporation et le retrait de variants d'histones (Han et al., 2015).

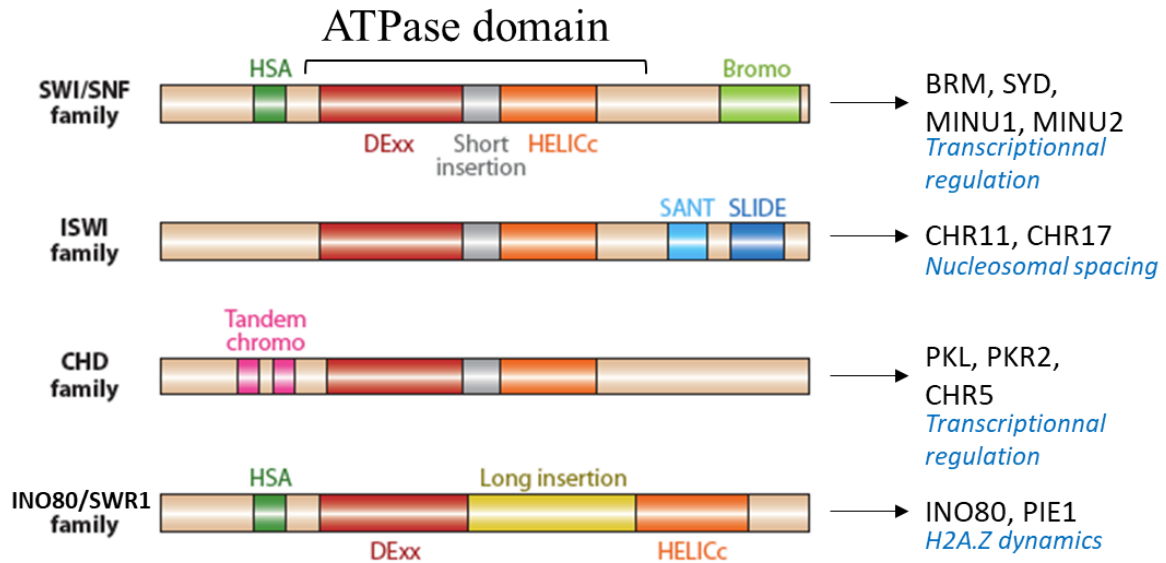


Figure 13 : Domaines présents pour les différentes familles de sous-unités ATPase des remodeleurs SWI/SNF. Les bromodomaines (Bromo) sont impliqués dans la reconnaissance de marques d'acétylation des queues d'histone, et les chromodomaines (Chromo) sont impliqués dans la reconnaissance des méthylations des queues d'histone. Les deux domaines DExx et HELICc permettent la translocation de l'ADN par rapport au nucléosome sur lequel le remodeleur est amarré. Les noms des représentants de ces familles chez *A. thaliana* et leurs fonctions connues sont indiqués à droite. Contrairement à BRM, les protéines SYD, MINU1 et MINU2 sont dépourvues de bromodomaine. Adapté de (Clapier and Cairns, 2009).

Chez *A. thaliana*, la famille ISWI est composée de deux remodeleurs partiellement redondants : CHROMATIN REMODELLING 11 et 17 (CHR11/CHR17) (Han et al., 2015). Ils sont requis pour permettre un espacement régulier des nucléosomes sur les gènes activement transcrits (Li et al., 2014). Cette fonction est liée à l'existence de régions au sein de ces protéines qui reconnaissent de l'ADN « linker » et permettent au remodeleur de sortir d'un état auto-inhibé : l'activité du remodeleur est ainsi poursuivie jusqu'à ce que le nucléosome transloqué soit suffisamment rapproché du nucléosome adjacent pour qu'il n'y ait plus d'ADN « linker » accessible pour stimuler le remodeleur (Clapier et al., 2017). Les nucléosomes étant déplacés de la fibre d'ADN au cours de la réplication, une telle activité de remodeleur est requise pour conserver un espacement régulier des histones au cours du cycle cellulaire (Clapier and Cairns, 2009).

Les remodeleurs peuvent interagir avec des enzymes qui modifient les queues d'histones : c'est le cas d'INO80. Ce dernier fait partie d'un large complexe protéique, qui interagit physiquement avec des complexes COMPASS-Like et contribue à l'établissement de la marque activatrice H3K4me3 indépendamment de son activité catalytique translocase (Shang et al., 2021).

Le remodeleur PICKLE (PKL) de la famille des CHD est impliqué dans la répression des gènes spécifiques de la graine au cours de la germination : chez les mutants *pkl*, les gènes *LEC1* et *ABI3* sont exprimés ectopiquement dans les racines, et cette expression ectopique est associée à une réduction des marques H3K27me3 (Zhang et al., 2012). PKL joue également un rôle répresseur pour les miR156 impliqués dans la transition entre phase juvénile et phase

adulte du développement végétatif : chez les mutants *pkl*, les gènes qui codent pour les miR156 sont surexprimés d'une façon liée à une perte de la marque H3K27me3 et à un gain de la marque H3K27ac. De plus, l'occupation nucléosomale est réduite chez les mutants *pkl* au niveau des premières kilobases de séquences codantes pour ces gènes (Xu et al., 2016a). Ainsi, bien que les remodeleurs aient été initialement classés comme des protéines TrxG par la suppression des phénotypes PcG qu'ils peuvent conférer, leur activité de remodelage de la chromatine peut également avoir un effet répressif sur les gènes cibles.

Les remodeleurs les plus étudiés sont ceux de la famille SWI2/SNF2 (**Figure 13**). Chez *A. thaliana*, cette famille possède quatre membres : MINU1, MINU2, BRAHMA (BRM) et SPLAYED (SYD) (Thouly et al., 2020). BRM et son homologue le plus proche SYD ont des fonctions partiellement redondantes, la double mutation *brm syd* étant létale au stade embryonnaire, et ils possèdent à la fois des cibles communes et des cibles spécifiques (Bezhanian et al., 2007).

BRM a une activité anti-PRC2 pour de multiples cibles et sa présence réduit l'occupation des *loci* par le PRC2, en association avec une perte de marques H3K27me3 (Li et al., 2015). Il joue en particulier un rôle activateur pour les gènes homéotiques floraux (Hurtado et al., 2006), et le recrutement de BRM et SYD aux gènes homéotiques floraux *AP3* et *AG* met en jeu les facteurs de transcription SEP3 et LFY (Wu et al., 2012). Pour la régulation des miR156, BRM joue un rôle opposé à celui de PKL : chez les mutants *brm*, l'occupation du PRC2 et les niveaux de marques H3K27ac sont réduits par rapport aux niveaux sauvages, tandis que les niveaux des marques H3K27me3 et d'occupation nucléosomale au début de la séquence codante sont augmentés par rapport au niveau sauvage. SYD est quant à lui un activateur spécifique de *WUS* (Kwon et al., 2005).

BRM peut également exercer un rôle répressif : ainsi, il est recruté par le facteur de transcription BP aux *loci* *KNAT2* et *KNAT6*, ce qui est associé à une perte de marques H3K4me3. Cette répression est indépendante de la marque H3K27me3, pour laquelle les niveaux sont identiques au contrôle sauvage chez les plantes *brm* pour ces deux *loci* (Yang et al., 2015).

En conclusion, les remodeleurs peuvent avoir des activités soit activatrices soit répressives sur les gènes auxquels ils sont recrutés, accompagnés d'effets divers sur les marques histone. Leur fonction catalytique peut permettre une régulation du niveau d'occupation nucléosomale sur des séquences spécifiques et donc de l'accessibilité à ces séquences.

I-B-5 Recrutement des facteurs chromatiniens

La plupart des facteurs chromatiniens sont dépourvus de domaines permettant la liaison à des séquences d'ADN spécifiques, et peuvent être recrutés à des *loci* spécifiques en s'associant à des facteurs de transcription qui reconnaissent des éléments *cis* (**Figure 14**). Par exemple, comme déjà évoqué précédemment, des désacétylases sont recrutées par des facteurs de transcription pour la répression des gènes de la famille *KNOX1* et des gènes homéotiques floraux.

Dans le cas des complexes PcG, des séquences *cis*, appelées Polycomb Response Elements (PRE), ont été démontrées suffisantes pour induire le recrutement des complexes PRC1 et/ou PRC2. Le recrutement s'effectue par l'intermédiaire d'une interaction avec des facteurs de

transcription qui reconnaissent les motifs contenus dans les PREs (Godwin and Farrona, 2022; Vachon et al., 2018). Ainsi, les facteurs VAL, qui reconnaissent les éléments RY, sont requis pour la répression des gènes de maturation de la graine au cours de la germination (Yang et al., 2013), et de *FLC* au cours de la vernalisation (Qüesta et al., 2016). Des tests simple-hybride de Levure, réalisés avec des séquences régulatrices d'*AG* et *AP3*, ont permis d'identifier le rôle des facteurs de transcription BASIC PENTACYSTEINE1 (BPC1) et ARABIDOPSIS ZINC-FINGER PROTEIN 1 (AZF1), qui reconnaissent respectivement des répétitions GAGAG et des motifs Telobox pour le recrutement du PRC2. Ces facteurs co-localisent avec FIE à la chromatine de nombreuses cibles du PRC2 telles qu'*AG* et *STM*, et leur recrutement artificiel au niveau d'un transgène est suffisant pour causer le recrutement de FIE à ce *locus*. Un rôle des TELOMERE BINDING PROTEINs (TRBs) a également été identifié pour le recrutement du complexe PRC2 via la reconnaissance des motifs Telobox : TRB1 interagit physiquement avec CLF, et chez le triple mutant *trb1/2/3*, dont le phénotype ressemble à celui de *clf*, les niveaux de marques H3K27me3 sont réduits à plusieurs *loci* dont *SEP3* et *AG* (Zhou et al., 2018).

Au niveau de *loci* spécifiques, il a été montré que la répression de *WUS* par *KNU* lors de la terminaison florale implique le recrutement de PRC2 par *KNU* au *locus WUS* (Sun et al., 2014). La répression des gènes *KNOX* dans la feuille en différenciation *via* la liaison d'*AS1/AS2* implique le recrutement du PRC2 par ces facteurs de transcription (Lodha et al., 2013). La répression de *WUS* par la liaison directe de *AG* implique le recrutement de la protéine PcG accessoire LHP1 (Liu et al., 2011). De même, le répresseur de la floraison *SVP* permet de recrutement de LHP1 au *locus SEP3* pour sa répression (Liu et al., 2009).

Les facteurs de transcription peuvent en fait être impliqués non seulement dans le recrutement de facteurs chromatinien, mais également dans leur éviction (Vachon et al., 2018) : il a été ainsi démontré qu'*AG* pouvait activer *KNU* en évinçant le PRC2 du *locus*, par compétition pour la liaison d'éléments régulateurs, ce qui aboutit à une perte progressive des marques H3K27me3 à ce *locus*, au cours des divisions cellulaires (Sun et al., 2014).

Le recrutement du complexe PRC2 pourrait également être effectué par la reconnaissance d'ARN longs non codants (lncRNAs): de tels mécanismes ont été démontrés dans le cas de la répression de *FLC* (Heo and Sung, 2011) et d'*AG* (Wu et al., 2018) (Vachon et al., 2018). Cependant, un article concernant le rôle du lncRNA HOTAIR dans la répression génique d'un gène *HOX* chez les cellules animales a récemment invalidé le postulat selon lequel cet ARN avait un effet répresseur *via* le recrutement du complexe PRC2. En effet, bien que le PRC2 (mais également la déméthylase H3K4 LSD1) interagisse physiquement avec cet ARN, (1) le recrutement artificiel de cet ARN au niveau d'un transgène rapporteur provoque la répression de ce dernier, y compris chez le mutants perte-de-fonction PRC2 ; (2) le PRC2 est également capable d'interagir avec un ARN artificiel complémentaire à HOTAIR, appelé HOTAIRrev, sans que le recrutement artificiel d'HOTAIRrev n'ait de conséquences sur l'expression du transgène rapporteur ou sur ses niveaux de marques H3K27me3. Les auteurs concluent que les propriétés répressives de HOTAIR sont indépendantes de l'activité PRC2 et que le gain de marques H3K27me3 observé lorsque HOTAIR est recruté est une conséquence de la répression transcriptionnelle du gène, et pas du recrutement du PRC2 *via* l'ARN (Portoso et al., 2017).

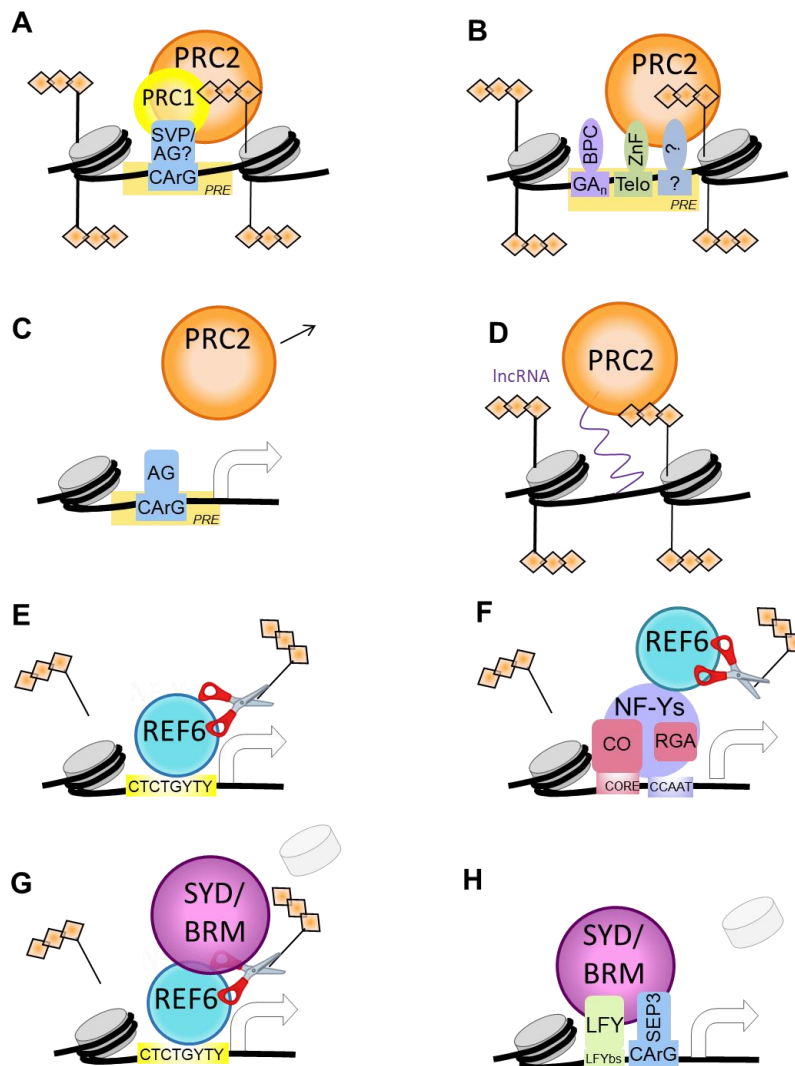


Figure 14 : Mécanismes de recrutement des modifieurs et remodeleurs de la chromatine. (A) : recrutement des complexes PRC2 et PRC1 via des facteurs de transcription MADS. (B) : recrutement du PRC2 à des PRE via la reconnaissance de motifs GAGAG et AZF1 via des facteurs de transcription des familles BPC et ZnF. (C) éviction du PRC2 par compétition avec le facteur de transcription AG pour la liaison à l'ADN. (D) recrutement du PRC2 via une interaction avec un ARN long non codant. (E) recrutement direct REF6 par la reconnaissance de motifs CTCTGYTY. (F) Recrutement indirect de REF6, via les facteurs de transcription NF-Y (G) recrutement esu remodeleurs BRM/SYD via la déméthylase REF6. (H) Recrutement de BRM/SYD via les acteurs de transcription LFY et SEP3. Adapté de (Vachon et al., 2018). Les noms et les rôles des différents acteurs représentés sur la figure sont expliqués dans le texte du manuscrit.

I-B-6 Dialogue entre différentes modifications chromatiniennes

Dialogue entre modifieurs de la chromatine

Les différentes modifications des queues d'histones sont influencées les unes par les autres par différents mécanismes : d'une part, des protéines appartenant à des complexes qui catalysent des modifications différentes peuvent interagir entre elles, et d'autre part, les marques déposées par un modifieur peuvent avoir un impact sur le recrutement et/ou l'activité catalytique d'un autre complexe modifieur.

Plusieurs modifications à effet répressif peuvent être apportées d'une façon coopérative à un même *locus*. Ainsi, dans le cadre de la répression de *FLC*, on observe une interaction physique entre la déméthylase H3K4me3 FLD et la désacétylase HDAC6 (Yu et al., 2011). HDAC6 interagit également physiquement avec le membre du PRC2 MSI1, et la mutation pour l'un des deux partenaires cause une réduction du recrutement de l'autre au *locus FLC* (Xu et al., 2022). Ainsi, les activités de déméthylation en H3K4, de désacétylation et de méthylation H3K27me3 au cours sont combinées pour à la répression du *locus FLC*. Une interaction physique a également été démontrée *locus* entre la méthyltransférase H3K36 SDG8 et la déméthylase H3K27 ELF6 pour l'activation *FLC* (Yang et al., 2016). REF6 participe au recrutement de BRM via la reconnaissance de séquences cibles par son domaine ZnF C2H2, ce qui permettrait une action concertée de ces deux facteurs dans l'activation de gènes cibles communs (Li et al., 2016) (**Figure 14-G**).

De plus, plusieurs facteurs de transcription impliqués dans le recrutement du PRC2 via la reconnaissance de séquences cis présentent des domaines EAR, ce qui permettrait un recrutement combiné du PRC2 et des désacétylases via une interaction avec les co-répresseurs TOPLESS (TPL) ou STRESS ASSOCIATED PROTEIN 12 (SAP12) : c'est le cas de BPC1/6, d'AZF1, de VAL1 et de KNU qui est impliqué dans la répression d'AG. Le recrutement artificiel d'un domaine EAR seul à un transgène est en fait capable à lui seul de causer à la fois une méthylation H3K27me3 et une désacétylation de ce dernier (**Figure 15**) (Baile et al., 2021b).

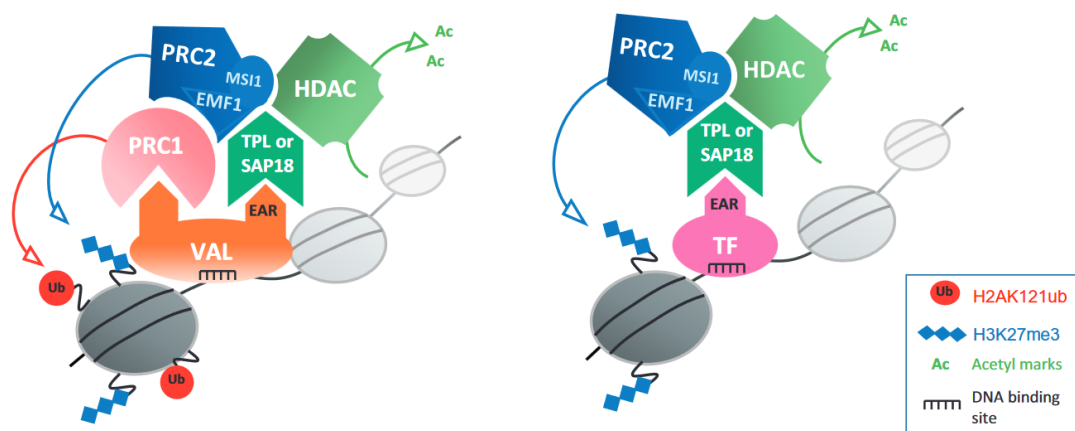


Figure 15 : Recrutement coopératif de plusieurs modificateurs chromatinien. La protéine VAL1 permet, via la reconnaissance d'éléments RY, le recrutement combiné du complexe PRC1, du complexe PRC2 et de désacétylases d'histones (par l'intermédiaire d'un corépresseur, TPL ou SAP10, recruté par le domaine EAR de VAL1). D'autres facteurs de transcription à domaine EAR tels que KNU, BPC1/6 ou AZF1 permettent le recrutement simultané du complexe PRC2 et de désacétylases d'histones. Source : (Baile et al., 2021b).

La coopération entre des marques épigénétiques différentes pour l'activation ou la répression de gènes peut également s'expliquer par le fait que certains modificateurs spécifiques pour une marque puissent porter, en plus de leur site catalytique, des domaines capables de lire d'autres marques. En effet de nombreux effecteurs chromatinien possèdent également des domaines connus pour leur capacité à reconnaître des modifications post-traductionnelles d'histones ; c'est par exemple le cas du bromodomaine porté par BRM, qui reconnaît les

histones acétylées (Thouly et al., 2020). C'est aussi le cas du domaine CW de la méthyltransférase H3K36me3 ASHH2/SDG8, qui reconnaît la marque H3K4me3 et permet ainsi un couplage entre ces deux marques activatrices (Hoppmann et al., 2011).

Enfin, les marques histones peuvent impacter l'activité catalytique des modificateurs de la chromatine. Il a été démontré que l'activité du complexe PRC2-EMF2, mais pas celle du PRC2-VRN2, était inhibée sur des peptides qui portent la marque H3K4me3 en *cis* (c'est-à-dire lorsque la marque H3K4me3 est portée par la même queue d'histone que celle qui est utilisée comme substrat) (Schmitges et al., 2011). Cet effet inhibiteur pourrait expliquer le fait que les marques H3K4me3 et H3K27me3 soient peu fréquemment colocalisées au niveau d'un même *locus* chez *A. thaliana*. Une inhibition de l'activité du PRC2 sur des peptides portant la marque H3K36me3 en *cis* a également été démontrée chez la Drosophile et l'Homme (Schmitges et al., 2011), et des expériences de cristallographie ont permis d'expliquer cette inhibition par le fait que la sous-unité catalytique du PRC2 est en contact physique avec le résidu H3K36 non méthylé, permettant d'orienter le résidu substrat H3K27 vers le site actif (Finogenova et al., 2020).

Dialogue entre modifications post-traductionnelles des histones, remodelage de la chromatine, et variants d'histones

Chez *A. thaliana*, il existe deux variants majeurs pour l'histone H3, H3.1 et H3.3, qui diffèrent par 4 résidus sur les 136 qui composent ces protéines, et sont incorporées à l'ADN par des chaperonnes différentes et dans des contextes différents. Le variant CENH3 est spécifiquement présent au niveau de l'hétérochromatine des régions centromériques, qui joue un rôle dans l'assemblage des kinétochores et la séparation des chromatides au cours des divisions cellulaires (McKinley and Cheeseman, 2016). La présence d'H3.1, incorporée par la chaperonne CAF-1, est couplée à la réplication de l'ADN (Ahmad and Henikoff, 2002) tandis que l'histone H3.3, incorporée par la chaperonne HIRA, est exprimée tout au long du cycle cellulaire, et est associée à des marques chromatiniennes activatrices et à une activation transcriptionnelle des gènes (Johnson et al., 2004). Un rôle a été proposé pour H3.1 dans la maintenance de la marque H3K27me3 : chez *A. thaliana*, au cours de la réplication, les méthyltransférases AXR5 et 6, connues pour réprimer les éléments transposables via le dépôt de la marque H3K27me1, seraient recrutées à la fourche de réplication. H3K27me1 servirait ensuite de substrat pour le PRC2, qui y ajouterait deux groupements méthyl supplémentaires pour restaurer la marque H3K27me3 sur les histones incorporées de nouveau. ATXR5/6 ayant une spécificité de substrat pour H3.1 par rapport à H3.3, la perte d'H3.1 a pour conséquence un défaut de maintenance d'H3K27me3 au cours des divisions cellulaires (Jiang and Berger, 2017).

Il existe quatre variants H2A différents chez *A. thaliana* : H2A, H2A.X, H2A.W et H2A.Z. Les histones H2A canonique incorporées lors de la réplication, et H2A.X, sont associées aux gènes activement transcrits et aux marques actives H3K4me3 et H3K36me3. H2A.W co-localise avec l'hétérochromatine et les marques H3K9me2, et joue un rôle dans la répression des transposons. Elle participerait à la condensation de l'hétérochromatine par son domaine C-terminal qui favoriserait les interactions entre fibres chromatiniennes (Yelagandula et al., 2014).

H2A.Z, qui peut être évincée par le complexe remodelleur INO80 et dont le dépôt fait intervenir le complexe remodelleur SWR1, est à la fois associée aux gènes inactifs et à certains gènes actifs. Dans le cas des gènes inactifs, ce variant recouvre l'ensemble du corps du gène, et sa présence est anti-corrélée à la présence d'H3.3, à la méthylation dans un contexte CG, et à l'histone « linker » H1.

Dans le cas des gènes actifs, la présence d'H2A.Z est restreinte au niveau du TSS. Cette occupation de H2A.Z au TSS est fréquemment accompagnée d'une occupation par BRM ; H2A.Z comme le remodelleur contribuent à la déstabilisation du nucléosome en position +1. L'étude des effets des pertes de fonction pour BRM et/ou pour le complexe remodelleur responsable de l'incorporation du variant H2A.Z ont permis de montrer que BRM et H2A.Z pouvaient agir de façon soit antagoniste soit coopérative pour réguler l'expression de leurs cibles communes (Torres and Deal, 2019). Dans le cas des gènes réprimés qui portent H2A.Z, la répression dépend de l'ubiquitinylation de ce variant d'histone par le complexe PRC1, mais pas de la méthylation H3K27me3 par le complexe PRC2 (Gómez-Zambrano et al., 2019).

Les gènes impliqués dans le développement des plantes sont soumis à des régulations au niveau chromatinien. Les enzymes capables d'altérer la structure de la chromatine appartiennent souvent à des familles multigéniques, dont les différents membres peuvent réguler des gènes et/ou des processus développementaux différents. En particulier, de nombreux gènes impliqués dans le maintien des méristèmes (WUS, STM...), dans le contrôle de la floraison (FLC, FT, SOC1...) et dans la morphogenèse de la fleur, des carpelles et des ovules (AG, AP3, SEP3, CRC, SHP1/2, STK...), sont soumis à la répression par les complexes Polycomb en-dehors des tissus dont ils régulent le développement. La marque H3K27me3 déposée par le complexe PRC2 permet de maintenir ces gènes dans un état inactif d'une façon robuste au cours des cycles de réplication de l'ADN. Le recrutement des facteurs chromatinien implique des interactions entre ces derniers et des facteurs de transcription qui reconnaissent des séquences ADN spécifiques. Cependant, certains mécanismes de recrutement du PRC2 ne semblent pas suffisants pour expliquer comment la structure chromatinienne répressive peut être instaurée ou levée uniquement des contextes spécifiques.

I-C ULTRAPETALA1 (ULT1), un régulateur chromatinien impliqué dans la levée de la répression médiée par PcG pour les gènes développementaux

I-C-1 ULT1, un facteur impliqué dans l'homéostasie du méristème

Le gène *ULTRAPETALA1* (*ULT1*), qui code pour une protéine spécifique du règne végétal, est impliqué dans de nombreux processus développementaux, notamment le développement foral. Tandis que les fleurs sauvages sont composées de quatre sépales, quatre pétales, six étamines et deux carpelles chez *A. thaliana*, les fleurs des mutants *ult1* présentent davantage d'organes floraux dans chacun des verticilles à cause de méristèmes floraux élargis (Carles et al., 2005; Fletcher, 2001) (**Figure 16-A, B**). De plus, des verticilles supplémentaires sont produits à l'intérieur des carpelles des fleurs *ult1*. Enfin, les mutants *ult1* produisent également plus de fleurs qu'une plante sauvage car leur méristèmes inflorescentiels sont eux aussi élargis (**Figure 16-C, D**).

L'ensemble de ces phénotypes est donc lié à une accumulation excessive de cellules méristématiques qui sont incorporées dans des organes surnuméraires, d'une manière similaire à ce qui se passe chez les mutants *clv* (Clark et al., 1997). Les effets des mutations *clv* et *ult1* étant additives, les mécanismes par lesquels *ULT1* et la voie *CLV* contrôlent l'homéostasie du méristème sont partiellement redondants (Fletcher, 2001). Dans les inflorescences *ult1*, on observe une augmentation de la taille de la zone de cellules méristématiques qui expriment *WUS* (Carles et al., 2005) (**Figure 16-E, F**), mais la zone d'expression du marqueur de cellule souche *CLV3* est de taille normale (Fletcher et al., 1999). Cependant les fleurs *ult1 wus* présentent davantage de sépales et pétales que les simples mutants *wus*, ce qui signifie que la production d'organes surnuméraires dans les premiers verticilles des fleurs *ult1* ne dépend pas exclusivement d'un dérèglement de l'expression de *WUS* (Carles et al., 2004).

Dans les fleurs des mutants *ult1*, l'expression d'*AG* est retardée dans une zone située au cœur du méristème floral et l'expression de *WUS* est prolongée au-delà du stade floral 7 (Carles et al., 2004) (**Figure 16-G, H**), ce qui pourrait être la cause de l'indéterminisme floral (Fletcher, 2001). De plus, *wus* est épistatique sur *ult1* pour l'indéterminisme floral (Carles et al., 2004), la dé-régulation de ces deux facteurs expliquerait la perte de déterminisme floral chez les fleurs *ult1*, chez qui un dôme de cellules méristématiques peut perdurer à l'intérieur du quatrième verticille (**Figure 16-I, J**), et produire des verticilles supplémentaires. (**Figure 16-K, L**), (Fletcher et al., 1999). La répression de *WUS* par *ULT1* semble mettre en jeu le facteur de transcription *ULTRAPETALA INTERACTING FACTOR 1* (*UIF1*). En effet, *ULT1* et *UIF1* ont des patrons d'expression similaires dans les fleurs et inflorescences, et interagissent physiquement l'un avec l'autre *in vivo*. Le domaine Myb d'*UIF1* reconnaît spécifiquement une séquence GTAGATTCCT localisée sur le promoteur de *WUS*, mais également une séquence AAGAATCTTT localisée dans le 1^{er} intron d'*AG*, et le domaine EAR d'*UIF1* est suffisant pour permettre la répression d'un transgène rapporteur (Moreau et al., 2016).

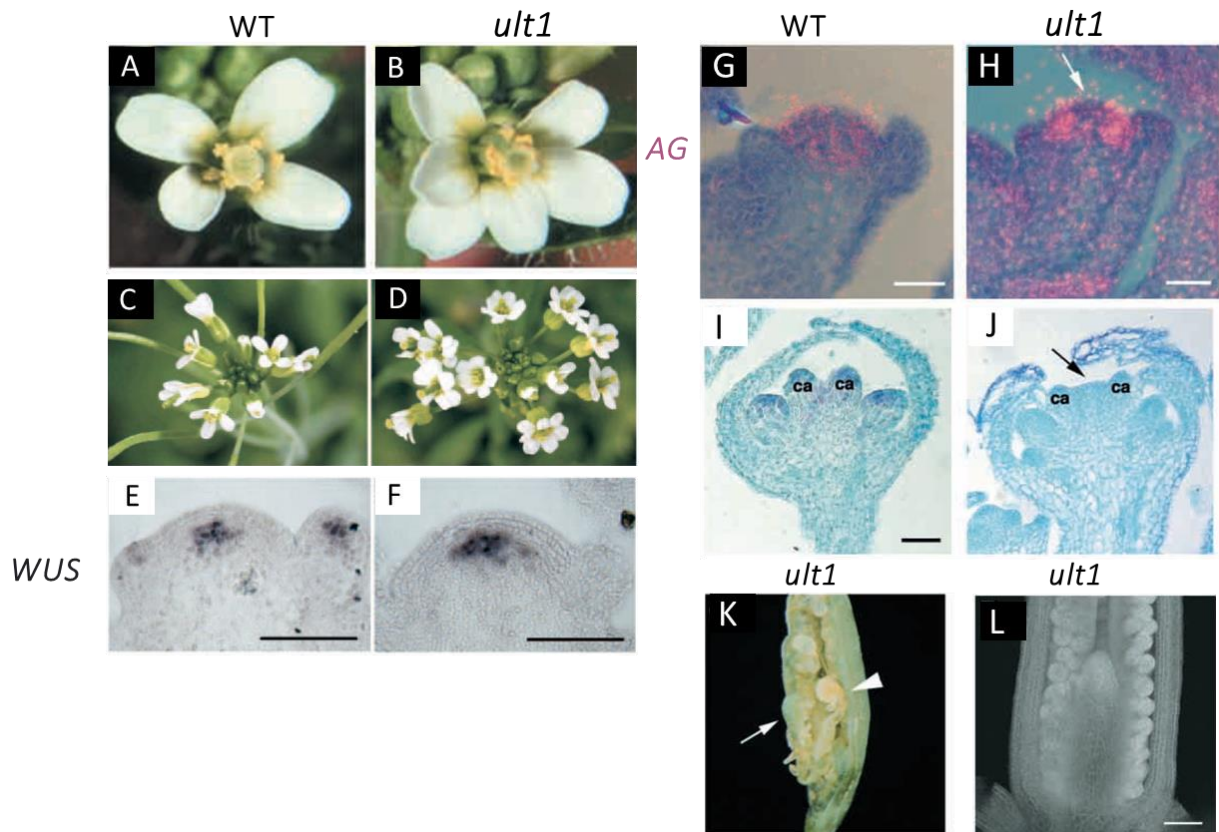


Figure 16 : phénotypes des mutants perte-de-fonction *ult1*. (A,B) les mutants *ult1* produisent davantage d'organes floraux que les plantes sauvages et (C,D) les inflorescences *ult1* produisent davantage de fleurs que les inflorescences sauvages. (E,F) le domaine d'expression de *WUS* est élargi dans les méristèmes inflorescentiels *ult1* et (G,H) l'expression d'*AG* est retardée au centre du méristème. (I,J) un dôme de cellules persiste en haut des méristèmes floraux *ult1* après la production des ébauches de carpelles. (K,L) les mutants *ult1* présentent des verticilles d'organes supplémentaires à l'intérieur du gynécée (indéterminisme floral), qui émergent du centre de la fleur. Photos publiées dans (Fletcher, 2001; Carles et al., 2005).

ULT1 joue également un rôle dans la transition florale, les mutants *ult1* fleurissant 1 à 2 semaines plus tard qu'une plante sauvage (Carles et al, 2005). Ce phénotype a pu être corrélé à un délai dans l'extinction du gène *FLC*, et à un retard dans l'expression des gènes inducteurs de la floraison et de l'identité inflorescentielle et florale *CONSTANS*, *FRUITFUL* et *LFY*, respectivement (Carles et al, non publié).

Enfin, ULT1 régule le fonctionnement du méristème apical racinaire et la régénération *de novo* de racines à partir d'explants de cotylédons, probablement en lien avec la signalisation par l'auxine. En effet, les méristèmes racinaires des mutants *ult1* sont désorganisés, la signalisation auxine est réduite en leur sein (Ornelas-Ayala et al., 2020), et les explants de cotylédons *ult1-3* génèrent des racines plus longues (Tian et al., 2022). ULT1 réprime le facteur de transcription *ERF109*, qui lui-même active l'enzyme de biosynthèse de l'auxine ASA1 : la mutation *ult1* favoriserait donc indirectement la synthèse de l'auxine, qui est nécessaire pour la génération de racines *de novo* (Tian et al., 2022).

I-C-2 *ULT1* possède un homologue chez *Arabidopsis* (*ULT2*), qui lui est partiellement redondant

Chez *A. thaliana*, *ULT1* possède un homologue, *ULT2*. Tandis que les simples mutants *ult2* sont indiscernables des plantes sauvages, les doubles mutants *ult1 ult2* ont des phénotypes aggravés par rapport aux simples mutants *ult1*. *ULT1* et *ULT2* sont donc partiellement redondants. L'expression d'*ULT1*, mais pas d'*ULT2*, est détectable dans les embryons, les plantules et les tissus végétatifs. Les patrons d'expression de ces deux gènes sont similaires dans la fleur : leur expression apparaît dans les ébauches florales de stade 1 puis, se restreint au centre du méristème, puis aux étamines et carpelles. Puisqu'un transgène *35S::ULT2* peut restaurer les phénotypes inflorescentiels d'*ult1*, *ULT1* et *ULT2* semblent être fonctionnellement équivalents dans la partie inflorescentielle de la plante (Carles et al., 2005).

La majorité des fleurs des double mutants *ult1 ult2* présente des excroissances contenant des tissus stigmatiques en position basale du pistil en développement, ce qui a permis de découvrir une fonction d'*ULT1* et *ULT2* dans l'établissement de la polarité apico-basale du gynécée (Monfared et al., 2013). Il a ensuite été montré qu'*ULT1/2* agissaient de façon coopérative et dose-dépendante avec les facteurs de transcription *KANADI1* et *2* (*KAN1/2*) avec qui ils interagissent physiquement, pour réprimer l'expression du facteur de transcription *SPATULA* (*SPT*) dans les zones basales du gynécée (Pires et al., 2014). En revanche, *ULT1/2* et *KAN1/2* jouent des rôles antagonistes dans l'établissement de la polarité abaxiale-adaxiale : en effet la mutation *ult1* peut supprimer les phénotypes adaxialisés du mutant *kan1*, dans les feuilles (Pires et al., 2015) comme dans le gynécée (Monfared et al., 2013).

I-C-3 *ULT1*, une protéine à domaine SAND

L'analyse de la séquence primaire d'*ULT1* et *ULT2* a permis de révéler la présence d'un domaine SAND (*Sp100*, *AIRE-1*, *NucP41/75*, *DEAF-1*), présent également dans plusieurs protéines animales dans lesquelles il est souvent associé à un ou plusieurs domaines fonctionnels, parmi lesquels des effecteurs et des lecteurs chromatinien (Carles et al., 2005). Ce domaine SAND est capable de se lier à l'ADN (Bottomley et al., 2001), et la protéine à domaine SAND *AIRE* peut activer la transcription de gènes rapporteurs (Pitkänen et al., 2001). *ULT1* et *ULT2* présentent également un domaine B-box-like. Les domaines B-box sont impliqués dans les interactions protéine-protéine et protéine-ARN (Borden, 1998; Torok and Etkin, 2001). L'association du domaine SAND à un domaine B-box like est conservée chez d'autres espèces végétales (Carles et al., 2004). Un rôle de régulateurs transcriptionnels a ainsi été proposé pour *ULT1* et *ULT2* (Carles et al., 2005), qui, comme les protéines à domaine SAND animales, pourraient établir un lien entre effecteurs chromatinien et transcriptionnels (Carles & Fletcher, Epigenetics 2010).

I-C-4 *ULT1*, un antagoniste du complexe PRC2

Les phénotypes des plantes qui surexpriment *ULT1* sont similaires à ceux des plantes *clf* et *35S::AG* : feuilles de taille réduite, recourbées vers le haut, floraison précoce et transformations homéotiques dans les organes floraux (**Figure 17-A**). De plus, dans un double mutant *clf ult1*, la perte de fonction d'*ULT1* restaure le phénotype du mutant *clf* vers un phénotype sauvage (**Figure 17-B**). *ULT1* agit donc génétiquement comme un antagoniste de

CLF. Au niveau moléculaire, les plantes *35S::ULT1* comme *clf* expriment ectopiquement *AG* et *AP3*, y compris dans les tissus végétatifs. L'analyse de plantes *35S::ULT1* dans un fond génétique mutant *ag* ou *ap3* montre que, comme les phénotypes *clf* (Goodrich et al., 1997), les phénotypes *35S::ULT1* sont causés par l'expression ectopique d'*AG*, et dans une moindre mesure d'*AP3* (Carles and Fletcher, 2009). De plus, l'analyse de l'expression des gènes homéotiques floraux dans des plantes *35S::AG ult1* montre qu'*ULT1* est requis par *AG* pour son auto-activation, ainsi que pour l'activation d'*AP3* par *AG*, mais pas pour celle de *SEP3* par *AG*. L'activation d'*AG* par *ULT1*, quant à elle, requiert à la fois la présence des séquences régulatrices présentes dans le promoteur d'*AG*, et de celles localisées dans son premier intron (Carles and Fletcher, 2009).

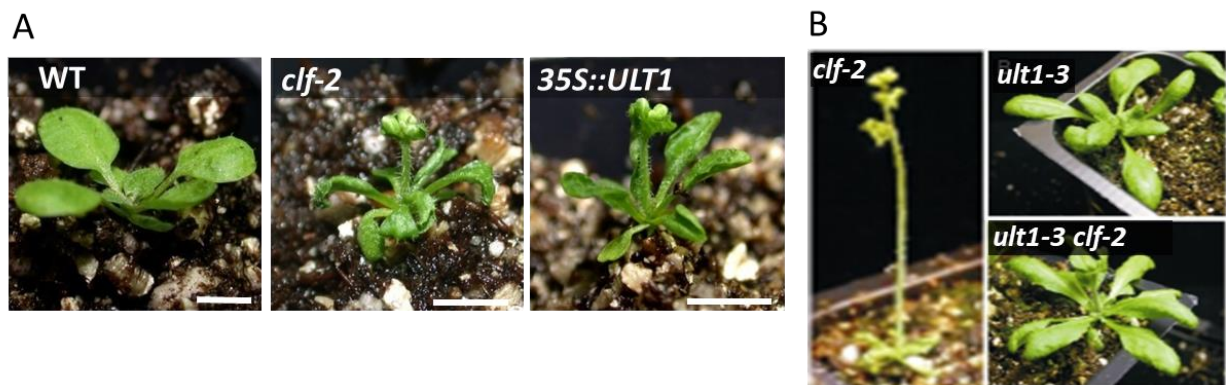


Figure 17 : *ULT1* est un antagoniste génétique de *CLF*. (A) : les phénotypes des plantes qui surexpriment *ULT1* (*35S::ULT1*) sont similaires à ceux des mutants perte-de-fonction *clf-2*. (B) : La mutation *ult1-3* sauve les phénotypes de floraison précoce et de feuilles recourbées vers le haut de *clf-2*. Photos publiées dans (Carles and Fletcher, 2009).

Des expériences de CHIP ont montré qu'*ULT1* se liait au *locus AG*, et que la dé-répression de ce gène chez les plantes *clf* et *35S::ULT1* était corrélée à une réduction des marques H3K27me3. De plus, *ULT1* interagit physiquement avec *ATX1* (Carles and Fletcher, 2009), une méthyltransférase H3K4me3 impliquée dans l'activation d'*AG* (Alvarez-Venegas et al., 2003), et la surexpression d'*ULT1* cause une augmentation des marques H3K4me3 au niveau du promoteur d'*AG*, c'est pourquoi il a été proposé de classer *ULT1* comme un facteur TrxG. *ULT1* et *ULT2* peuvent tous deux activer des gènes connus pour être cibles de la répression PcG, parmi lesquels des gènes homéotiques floraux (*AP2*, *AP3*, *PI*, *SEP1-4*), des gènes impliqués dans l'induction de la floraison (*SOC1*, *LFY*), et des gènes *KNOX1* méristématiques (*STM*, *BP*, *KNAT2*, *KNAT6*) (Monfared et al., 2013).

ULT1 est également un antagoniste génétique de la protéine PcG *EMF1* : en effet la mutation *ult1* sauve les phénotypes des plantes *LFYasEMF1* (qui expriment un ARN antisens dirigé contre *EMF1* sous le promoteur de *LFY*) liés à l'activation ectopique des gènes homéotiques floraux, mais également de gènes qui promeuvent la floraison. Pour les *loci AP3* et *PI*, leur surexpression chez *LFYasEMF1* est associée à une perte de la marque H3K27me3, dont le niveau est restauré à un niveau sauvage chez *ult1-3 LFYasEMF1* (Pu et al., 2013).

Le gène *OsULT1*, homologue d'*ULT1* chez le riz, s'exprime dans des plantes soumises à des températures froides ou à un stress salin. En réponse au stress induit par le froid, *OsULT1* se

lie au promoteur du gène de réponse *OsDREB1b*, ce qui est accompagné d'une perte de marques H3K27me3 et d'un gain de marques H3K27ac. Le domaine SAND d'OsULT1 reconnaît spécifiquement un motif GAGAG contenu dans le promoteur d'*OsDREB1b* : des mutations dans ce motif abolissent la liaison d'ULT1. Le domaine B-box d'OsULT1 se lie également au promoteur *OsDREB1b*, mais d'une manière moins spécifique. Les motifs GAGA sont connus pour être capables de recruter le complexe PRC2 via sa reconnaissance par les facteurs de transcription de la famille BPC (Xiao et al., 2017). Ainsi, OsULT1, en reconnaissant une séquence impliquée dans le recrutement du PRC2, pourrait jouer un rôle activateur par compétition avec ce dernier pour la reconnaissance du motif GAGAG, ce qui donnerait une explication à l'antagonisme entre ULT1 et le complexe PRC2.

Cependant, les analyses des triples mutants *emf1 ult1 atx1* montrent qu'ULT1 et ATX1 jouent également un rôle répresser sur plusieurs gènes. Parmi les gènes réprimés par EMF1, ULT1 et ATX1, on retrouve les gènes spécifiques de la graine *LEAFY COTYLEDON 2 (LEC2)* et *ABA INSENSITIVE 3 (ABI3)*. Cette expression ectopique des gènes de la graine dans les triples mutants *emf1 ult1 atx1* expliquerait les phénotypes de racine gonflée, liés à une accumulation anormale de lipides de graine. (Xu et al., 2018a). En fonction des gènes considérés, ULT1 peut donc agir comme un répresser ou comme un activateur.

Des expériences de CHIP-seq, dont les résultats n'ont pas encore été publiés (Engelhorn et al.), ont été réalisées pour les marques H3K27me3 sur des plantules de 8 jours sauvages, *ult1-2*, *ult1-3* et *35S::ULT1*. Ces expériences ont permis d'établir une liste de 916 gènes cibles pour l'activation par ULT1, c'est-à-dire pour lesquels les niveaux de marque H3K27me3 est augmenté chez les mutants perte-de-fonction et réduit chez la lignée d'expression ectopique. Parmi ceux-ci, on peut noter les gènes homéotiques floraux tels qu'*AG* et *SEP3*, des gènes du développement du carpelle tels que *CRC*, des gènes *KNOX* méristématiques comme *STM*, les intégrateurs floraux *FT* et *SOC1*, les *miR172* qui répriment les facteurs de transcription de la famille *AP2*, ainsi qu'*EMF1*. Une liste de 1362 gènes réprimés par ULT1, c'est-à-dire pour lesquels les niveaux de marque H3K27me3 est diminué chez les mutants perte-de-fonction et augmenté chez la lignée d'expression ectopique, a également été établie, dans laquelle les gènes *WUS* et *FLC* sont retrouvés.

ULT1 est un gène impliqué dans de nombreux processus développementaux tels que l'homéostasie des méristèmes, la transition florale, le déterminisme floral et le développement des carpelles. Les voies par lesquelles ULT1 peut avoir un impact sur l'expression de ses cibles peuvent mettre en jeu des interactions physiques entre ULT1 et des facteurs de transcription (UIF1, KAN1, KAN2) ou des effecteurs chromatinien (ATX1). ULT1 impacte la régulation d'un grand nombre de gènes ciblés par la répression PRC2, sans pour autant posséder de domaines catalytiques identifiables qui permettraient une action directe sur la structure de la chromatine. ULT1 pourrait donc être qualifié de « régulateur chromatinien », et agir par des interactions avec des effecteurs chromatinien, modifieurs ou remodeleurs de la chromatine, pour la régulation de gènes développementaux.

I-D Objectifs de la thèse

Dans le contexte de l'état de l'art présenté dans les sections I-A à I-C, le but de ma thèse a été de disséquer comment ULT1 pouvait interagir avec les effecteurs, modifieurs ou remodeleurs de la chromatine pour la régulation de gènes cibles.

(i) Une première partie est consacrée à l'étude des interactions entre ULT1 et les enzymes qui déposent et retirent la marque inhibitrice H3K27me3. Les pertes des marques H3K27me3 sur les cibles pour l'activation par ULT1 pourraient être liées à un retrait actif de ces marques par les HDMT ELF6, REF6 et JMJ13, ou à une inhibition de leur dépôt par le complexe PRC2. J'ai ainsi d'une part cherché à tester si l'action d'ULT1 dépendait des actions de ces trois HDMTs, et d'autre part cherché à mieux caractériser l'interaction physique qui se produit *in vivo* entre ULT1 et les HMT CLF et SWN, qui pourrait être le support de l'antagonisme observé entre ULT1 et le complexe PRC2.

(ii) Une seconde partie est consacrée à l'étude des interactions entre ULT1 et des remodeleurs de la chromatine car ceux-ci peuvent contrecarrer la répression maintenue par le complexe PRC2 par l'ouverture de la chromatine. J'ai ainsi cherché à caractériser les interactions génétiques entre ULT1/2, et le remodeleur BRM, à tester si la fonction BRM était requise pour l'activation de cibles d'ULT1, et à mieux caractériser une interaction physique entre ULT1 et les remodeleurs BRM et SYD, qui pourrait jouer un rôle pour le fonctionnement coopératif d'ULT1 et des remodeleurs pour la régulation de certains processus développementaux.

Afin d'atteindre ces objectifs, j'ai développé une stratégie de génétique moléculaire, incluant des analyses d'expression dans différents fonds génétiques, et des tests d'interactions physique.

MATERIEL ET METHODES

II Matériel et méthodes

II-A Matériel

Matériel végétal

Les lignées d'*Arabidopsis thaliana* utilisées et les écotypes dans lesquels elles sont disponibles sont référencés dans le tableau ci-dessous.

Nom de l'allèle	Type d'allèle	Référence
<i>ult1-3</i> (Ler, Col-0)	ADN-T (SALK 074642)	(Carles et al., 2005)
<i>ult2-2</i> (Ler, Col-0)	EMS	(Monfared et al., 2013)
<i>ref6-3</i> (Col-0)	ADN-T (SAIL_747_A07)	(Lu et al., 2011)
<i>ref6^c</i> (Col-0)	CRISPR-Cas9	(Yan et al., 2018)
<i>elf6-3</i> (Col-0)	ADN-T (SALK 074694)	(Yan et al., 2018)
<i>jmj13^G</i> (Col-0)	ADN-T (GABI-Kat 113B06)	(Yan et al., 2018)
<i>brm-101</i> (Ler)	EMS	(Bezhani et al., 2007)
<i>brm-106</i> (Ler)	EMS	(Efroni et al., 2013)

Tableau 1 : Liste des lignées d'*Arabidopsis thaliana* utilisées dans cette thèse

Bactéries et levures

Les clonages ont été réalisés avec des bactéries *E. coli* DH5 α thermo-compétentes (Invitrogen™). Les expériences de double hybride de levure ont été réalisés avec les souches Y187 at AH109.

Oligonucléotides

Les oligonucléotides utilisés sont référencés dans le tableau ci-dessous.

Nom	Séquence	Usage
oULT1-F	ATGGCGAACAATGAGGGAGAG	Génotypage <i>ult1-3</i>
oULT1-R	TCAAGCTTTGACATTGCTGG	Génotypage <i>ult1-3</i>
oULT2-F	ATGGAGAGAGAATGTGGGTC	Génotypage <i>ult2-2</i>
oULT2-R	TCAAATGGGTTTGGCATTG	Génotypage <i>ult2-2</i>
ref6c-F	GGTTGCTCCAGAGTTCAGACC	Génotypage <i>ref6^c</i>
ref6c-R	CATGGTCCTCCACATGCCAAGC	Génotypage <i>ref6^c</i>
ref6-3-LP	AGGTTTGGATGTACATCAGG	Génotypage <i>ref6-3</i>
ref6-3-RP	CAGTTGCAACTCTGGAGAAGG	Génotypage <i>ref6-3</i>
elf6-3-LP	TTTGCAGATCCCATTGCTTAC	Génotypage <i>elf6-3</i>
elf6-3-RP	ACGTCAATGCGGTAATCATTC	Génotypage <i>elf6-3</i>
jmj13G-LP	GGAATGTTTGGCTGACACTTGG	Génotypage <i>jmj13G</i>
jmj13G-RP	TCAAGTTCCATTTGCTGCTTC	Génotypage <i>jmj13G</i>
LbB1-3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC	Génotypage lignées SALK
LB1	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC	Génotypage lignées SAIL

o8409	ATATTGACCATCATACTCATTGC	Génotypage lignées Gabi-Kat
oGV164	TTTGGCTGGCGTTGGCAGGATGTGAGAGA TCGATATTACGCTCACGCGCCCATGTCT	Génotypage <i>brm-101</i>
oGV165	CAGTTTGCTCGCGGTGAAAGGCAG	Génotypage <i>brm-101</i>
oGV181	AGGTTTGCGCCATGAAGTTCAATGTCCTCGTTACG	Génotypage <i>brm-106</i>
oGV182	CAATCATGAAATGCTTTTCGATTGTCAAAGACATCA	Génotypage <i>brm-106</i>
oGV38	AACTCTATGCAGCATTGATCCACT	RT-qPCR MON1
oGV39	TGATTGCATATCTTTATCGCCATC	
REF6-q-F	CCGGAATACCGTGTTCAGGTTAG	RT-qPCR <i>REF6</i>
REF6-q-R	TCCCGGAAAGGTGACGACAAAC	
ULT1-q-F	ATGCCGCTTGCACCACAATG	RT-qPCR <i>ULT1</i>
ULT1-q-R	TCTTGTCGATGGGAAATCTGAGC	
oCT26	AACAGGCAATTGATGGGTGAGACG	RT-qPCR <i>AG</i>
oCT27	TCTGCCTTCCAAGTTCCTGAGC	
oGV34	CCACCAGAACCATCACCCTATT	RT-qPCR <i>AP3</i>
oGV35	GTCAGAGGCAGAGGGTGCAT	
oCT16	AGGAACGCATGCTGACTGAGAC	RT-qPCR <i>SEP3</i>
oCT17	GCATCTGATACCCATCAGCTAACC	

Tableau 2 : Liste des oligonucléotides utilisés dans cette thèse.

Plasmides

Les constructions utilisées pour les expériences de double-hybride de levure (Y2H) ont été introduites dans les vecteurs pGAD-T7 et pGBK-T7 (Clontech). pGAD-T7 permet la production d'une protéine d'intérêt en fusion C-terminale du domaine GAL4-AD (domaine de transactivation du facteur de transcription GAL4), et pGBK-T7 permet la production d'une protéine d'intérêt en fusion C-terminale du domaine GAL4-BD (domaine de liaison à l'ADN de GAL4) (**Figure 18**).

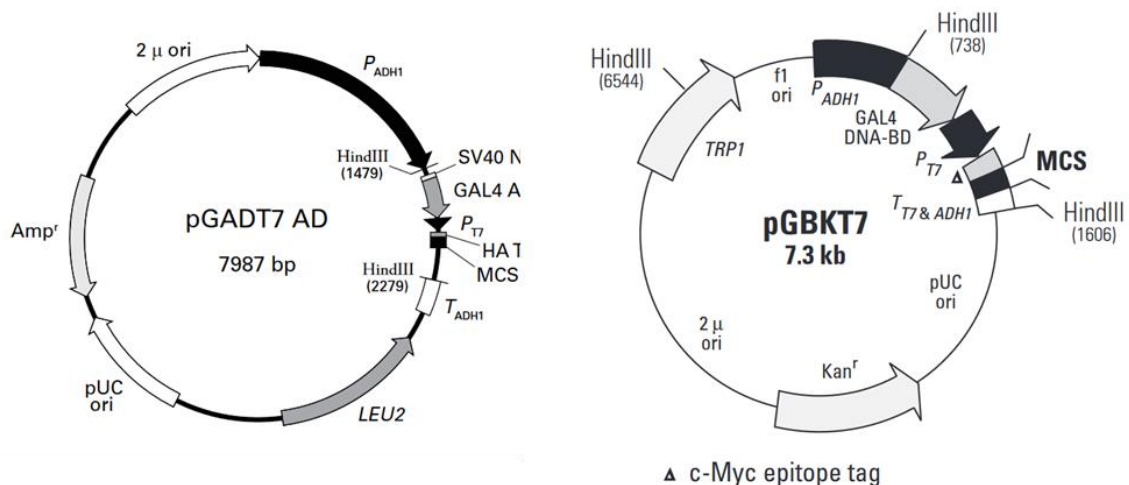


Figure 18 : Carte des vecteurs pGADT7 et pGBKT7 dans lesquels ont été introduites les constructions utilisées pour les tests en double hybride de levure.

II-B Méthodes

Conditions de cultures des plantes

Sauf mention contraire, les plantes ont été cultivées soit en jours longs (JL : 16h de jour à 20°C, 8h de nuit à 18°C) soit en jours courts (JC : 8h de jour à 18°C, 16h de nuit à 16°C). Avant semis, les graines ont passé 2h à -80°C, puis ont été stérilisées à l'aide d'une solution javalisée (1,3 % de chlore actif ; 0,02% Tween-20), puis lavées 3 fois avec de l'eau stérile. Les graines imbibées ont ensuite été laissées à 4°C à l'obscurité pendant 2 jours afin de synchroniser la germination (étape dite de « stratification »), puis semées sur des boîtes de milieu 0,5x MS avec vitamines (Murashige and Skoog, 1962), MES KOH 100mM pH 5,8 additionné de sucrose 1% et des antibiotiques adaptés. Après environ 10 jours, les plantules ont été transférées dans un mélange de terreau et de vermiculite (ratio 1:5).

Extraction d'ADN

L'ADN génomique des plantes a été extrait à partir de feuilles (l'équivalent de 25 mm²) transférées dans des microtubes de 2mL puis congelées à -80°C et broyées avec un broyeur mécanique (MM30, Retsch/Qiagen) pendant 2min par une bille de verre insérée dans le microtube. Du tampon Edwards (Tris pH 7,5 200mM ; NaCl 250mM, EDTA 25mM, SDS 0,5%) a ensuite été ajouté, et les échantillons ont été vortexés puis centrifugés. Pour précipiter l'ADN, le surnageant a été mélangé avec un volume identique d'isopropanol. Après centrifugation et élimination du surnageant, le culot a été lavé avec de l'éthanol à 70%. Après retrait de l'éthanol et séchage complet du culot, ce dernier a été resuspendu dans 10 à 50 µL d'eau.

Génotypage

Pour les lignées à ADN-T, deux PCR ont été réalisées, une pour amplifier l'ADN sauvage du gène muté (oligo-nucléotides -F et -R ou -LP et -RP du gène), et l'autre pour amplifier l'allèle mutant (avec l'oligo -F ou -LP du gène concerné et un oligo-nucléotide contenu dans l'ADN-T). Pour la lignée *ref6^C*, une seule PCR a été réalisée, la délétion contenue dans l'allèle mutant permettant de faire la différence entre allèles sauvage et mutant par la différence de longueur de l'amplicon (698 pb pour l'allèle sauvage, 433 pb pour l'allèle mutant). Pour les lignées EMS *ult2-2* et *brm-106*, le produit PCR obtenu a été envoyé au séquençage avec les mêmes oligos que ceux utilisés pour réaliser la PCR. La lignée *brm-101* est génotypée par dCAPS (« derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences ») : le produit PCR obtenu est digéré avec l'enzyme *AccI*, qui permet un clivage de l'amplicon pour l'allèle mutant mais pas pour celui de l'allèle sauvage : la migration des produits de digestion sur un gel d'agarose 3% permet de discerner les allèles sauvage et mutant par la taille des produits de digestion (pb pour l'allèle sauvage, 204 pb pour l'allèle mutant).

Purification d'ARN et préparation d'ADNc

Les ARN de plantes ont été extraits en utilisant le kit RNeasy™ plant mini kit (Qiagen) selon les instructions du fabricant. Afin d'améliorer les concentrations obtenues en ARN, j'ai laissé reposer l'eau permettant l'élution des ARN sur les colonnes pendant 1h avant de centrifuger ces dernières. Les concentrations des ARN ainsi extraits ont ensuite été mesurés, et leur pureté vérifiée avec un spectrophotomètre Nanodrop™ 2000. La dégradation de l'ADN génomique résiduel et la réaction de transcription inverse ont été réalisées sur 1,6 µg d'ARN avec le kit Master Mix SuperScript™ IV VIL0™ avec enzyme ezDNase™, selon les instructions du fabricant.

PCR quantitative

Les PCR quantitatives ont été réalisées avec le Master mix Power SYBR™ Green (ThermoFisher), en utilisant 2µL de produit de RT (dilué 32 à 64 fois, selon les résultats obtenus pour la gamme de dilution préalable), et avec les oligonucléotides sens et antisens chacun à une concentration finale de 0,2 µM, dans un volume total de réaction de 10 µL. Des triplicats techniques ont été réalisés pour chaque échantillon analysé. La réaction de PCR quantitative a été réalisée sur un appareil Biorad CFX connect (40 cycles de PCR en deux étapes : 95°C pendant 15 secondes puis 60°C pendant une minute). Les résultats ont été exploités en utilisant la feuille de calcul REST (Pfaffl et al., 2002), en excluant de l'analyse les puits pour lesquels la différence de CT par rapport aux deux autres réplicats techniques est supérieure à 0,5.

Tests en double hybride de levure

Milieux de culture de levures

Des boîtes d'agar 0,8% contenant différents milieux ont été préparées, à partir de poudres de marque MP :

- Milieu riche Yeast extract Peptone Dextrose (YPD), supplémenté en adénine 20mg/mL, noté par la suite YPD
- Milieu sélectif Yeast Nitrogen Base (YNB) avec sulfate d'ammonium, supplémenté avec du glucose 2 % final et du Complete Supplement Mixture (CSM) dépourvu de leucine, noté par la suite YNB + CSM – L
- YNB avec sulfate d'ammonium, glucose 2% et CSM dépourvu de tryptophane, noté par la suite YNB+ CSM – T
- YNB avec sulfate d'ammonium, glucose 2% et CSM dépourvu de leucine et tryptophane, noté par la suite YNB + CSM – LT
- YNB avec sulfate d'ammonium, glucose 2% et CSM dépourvu de leucine, tryptophane, adénine et histidine, noté par la suite YNB + CSM – LTAH

Transformation des levures

Les vecteurs pGADT7 ont systématiquement été transformés dans les levures de souche AH109 et les vecteurs pGBKT7 dans les levures de souche Y187. Les levures Y187 et AH109 ont

été pré-cultivées pendant 24h à 30°C sur des boites YPD. Elles ont ensuite été prélevées et resuspendues dans 1mL d'eau stérile, puis lavées deux fois à l'eau. Le surnageant a été retiré. 500 µL solution de transformation préparée extemporanément (PEG 3350 40%, Acétate de Lithium 0,1M, Tris-HCL pH 7,5 10mM, EDTA 1mM) ont ensuite été ajoutés au culot de levures, ainsi qu'environ 1µg de vecteur à transformer et 100µg d'ADN compétiteur (ADN de sperme de saumon cisailé 10µg/mL Invitrogen™). Après avoir mélangé le contenu des tubes, ces derniers ont été laissés à température ambiante pendant 15 minutes. 57 µL de DMSO a ensuite été ajouté et les levures ont été transformées par choc thermique (15 min à 42°C). Le surnageant a ensuite été retiré, et les levures resuspendues dans 200µL d'eau, puis étalées sur des boites YNB + CSM – T pour la sélection des levures transformées avec des vecteurs pGBK-T7, et des boites YNB + CSM -L pour les transformations avec des vecteurs pGAD-T7. Les boites de milieu sélectif ont été incubées à 30°C pendant 48h.

« Mating »

Les levures transformées sélectionnées sur boites ont été resuspendues dans 100µL d'eau. Des gouttes de 5µL de levures contenant un vecteur pGADT7 et de 5µL de levures contenant un vecteur pGBKT7 ont été superposées sur des boites de YPD avec adénine, qui ont été incubées à 30°C pendant 24h. Les levures ont ensuite été resuspendues dans 50µL d'eau et transférées sur des boites YNB + CSM – LT afin de sélectionner les levures ayant incorporé les deux vecteurs. Les boites sélectives ont été incubées à 30°C pendant 48h.

Tests d'interaction

Les levures contenant à la fois vecteur pGADT7 et un vecteur pGBKT7 ont été resuspendues dans de l'eau à deux concentrations différentes, mesurées avec un spectrophotomètre : $DO_{600nm}=10$ et $DO_{600nm}=1$. Des gouttes de 5µL de levures resuspendues aux deux concentrations ont ensuite été déposées sur des boites de milieu YNB + CSM -LT (contrôle) et YNB + CSM - LTAH (test d'interaction). Ces boites ont été mises à incuber à 30°C, et des photos ont été prises toutes les 24h.

RESULTATS ET DISCUSSION

III Résultats et discussion

III-A Interactions entre ULT1 et les modifieurs de la chromatine

ULT1 est un facteur qui joue un rôle clé dans l'activation de gènes cibles sur lesquels le PRC2 fonctionne en répresseur. En effet, l'équipe a montré qu'ULT1 induisait la diminution de l'abondance de la marque H3K27me3 (déposée par le PRC2) sur au moins 916 *loci* cibles (Julia Engelhorn et al., non publié). Or, la séquence de la protéine ULT1 ne révèle aucun domaine porteur d'une activité enzymatique qui pourrait permettre une modification directe de la marque répressive H3K27me3. L'effet d'ULT1 sur la chromatine des cibles pourrait donc être médié par une interaction avec un modifieur de la chromatine qui porte une telle activité. Deux hypothèses sont envisagées pour expliquer par quels mécanismes ULT1 pourrait activer ses cibles soumises à une répression PRC2 :

- (1) ULT1 pourrait contribuer à la déméthylation active pour les marques H3K27me3 via une interaction avec une déméthylase.
- (2) ULT1 pourrait empêcher la maintenance de la marque de méthylation H3K27me3 par une interaction inhibitrice avec une méthyltransférase du complexe PRC2. Les marques pourraient ainsi être diluées par l'incorporation de nouvelles histones non méthylées au cours des cycles de réplication de l'ADN associés à la division cellulaire.

Afin de tester ces deux hypothèses, j'ai mis en œuvre différentes approches.

Dans un premier temps, j'ai testé par une approche de génétique moléculaire l'hypothèse selon laquelle la fonction activatrice d'ULT1 dépendrait d'une interaction avec une histone déméthylase (HDMT) spécifique d'H3K27me3. Puis je me suis intéressée dans un second temps à l'interaction physique entre ULT1 et les histones méthyltransférases (HMT) CLF et SWN du complexe PRC2. En effet, cette interaction a déjà été révélée *in vivo* par des approches de BiFC et de double hybride en levure, dans l'équipe (données non publiées). J'ai donc mis en œuvre une approche de double hybride afin de cartographier les domaines protéiques impliqués dans cette interaction.

III-A-1 Interactions entre ULT1 et les déméthylases d'H3K27me3

Pour rappel, chez *A. thaliana*, trois homologues proches appartenant à la famille Jumonji codent pour des déméthylases spécifiques pour H3K27me3 : *EARLY FLOWERING 6/JUMONJI11 (ELF6/JMJ11)* (Crevillén et al., 2014), *RELATIVE OF EARLY FLOWERING 6/JUMONJI12 (REF6/JMJ12)* (Lu et al., 2011) et *JUMONJI13 (JMJ13)* (Yan et al., 2018; Zheng et al., 2019).

Les phénotypes des mutants pour chacune de ces déméthylases sont différents : floraison précoce pour *elf6* (Noh et al., 2004) et *jmj13* (Yan et al., 2018) mais tardive pour *ref6* (Noh et al., 2004), comme pour les mutants *ult1*. Des phénotypes additionnels apparaissent chez les mutants nuls multiples : Les doubles mutants *elf6 ref6* sont des plantes naines avec des feuilles recourbées vers le bas dont les fleurs présentent un nombre d'organes floraux supérieur aux fleurs sauvages. Les triples mutants *elf6 ref6 jmj13* ont un temps de floraison normal et présentent, en plus des phénotypes d'*elf6 ref6*, un indéterminisme floral dans 70% des fleurs,

aboutissant à la formation de siliques courbées (Yan et al., 2018). Il existe donc une redondance fonctionnelle partielle entre ces trois enzymes, et des similarités entre les défauts phénotypiques des mutants pour ces enzymes et ceux des mutants *ult1*. L'ajout de mutations perte-de-fonction pour JMJ30 et JMJ32, deux autres protéines Jumonji phylogénétiquement plus éloignées pour lesquelles une activité déméthylase sur H3K27me3 a été démontrée (Gan et al., 2014), n'aggrave pas les phénotypes du triple mutant *elf6 ref6 jmj13*. Il n'y a donc pas de redondance fonctionnelle majeure entre le groupe ELF6, REF6, JMJ13 et le groupe JMJ30, JMJ32.

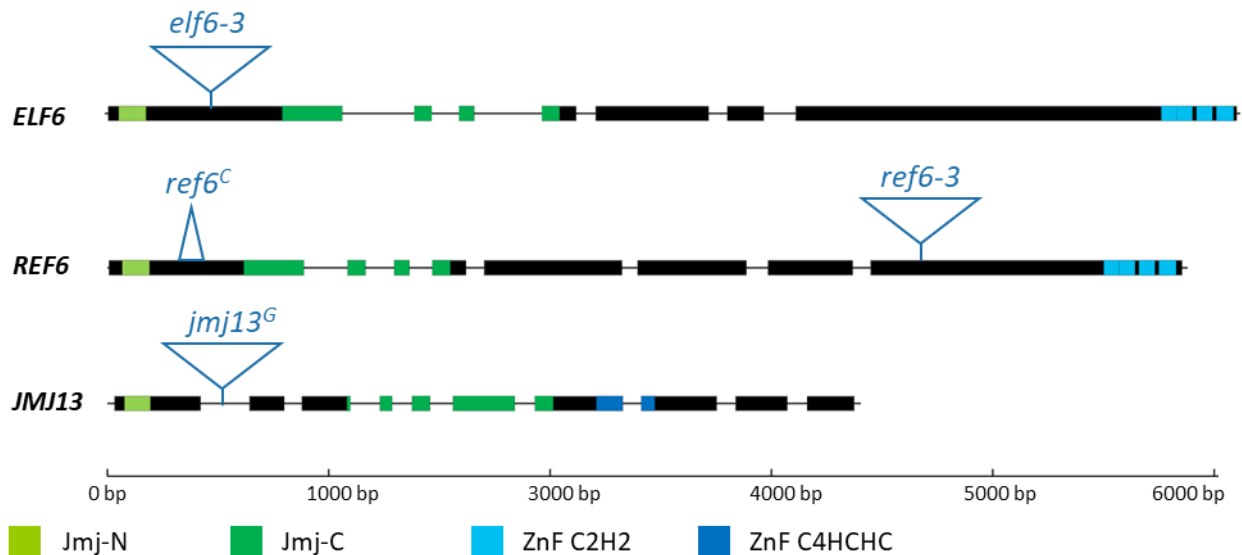


Figure 19 : Description des domaines fonctionnels et des allèles utilisés pour les déméthylases d'H3K27me3. Les allèles ADN-T *jmj13^G* (lignée GABI-Kat113B06) et *elf6-3* (lignée SALK_074694) sont des allèles nuls. L'allèle ADN-T *ref6-3* (lignée SAIL_747_A07) est un allèle hypomorphe qui permet la synthèse d'une protéine pourvue du domaine catalytique JUMONJI mais dépourvue des doigts de zinc en position C-terminale. L'allèle *ref6^C*, décrit dans (Yan et al., 2018), est un allèle nul obtenu par CRISPR qui contient une délétion de 268 paires de bases en amont du domaine JmjC menant à la production d'une protéine tronquée.

ELF6, REF6 et JMJ13 présentent plusieurs domaines fonctionnels (**Figure 19**), parmi lesquels les domaines JMJ-N et JMJ-C qui portent l'activité catalytique, et des domaines à doigt de Zinc de type C2H2 (pour ELF6 et REF6) ou C4HCHC (pour JMJ13) (Zheng et al., 2019), qui permettraient leur recrutement via la reconnaissance directe de séquences d'ADN spécifiques.

Des plantes transformées avec une construction gain-de-fonction *35S::REF6-YFP-HA* ou *35S::JMJ13* sont naines, fleurissent précocement et présentent des feuilles recourbées vers le haut : ces phénotypes ressemblent à ceux des mutants perte-de-fonction pour le PRC2 et des lignées *35S::ULT1* (Lu et al., 2011; Noh et al., 2004; Zheng et al., 2019; Goodrich et al., 1997; Carles and Fletcher, 2009). Ces ressemblances phénotypiques sont liées à l'activation ectopique de gènes communs dans ces trois contextes. En effet, l'expression ectopique des gènes homéotiques floraux *AG* et *SEP3* est causale pour les phénotypes des feuilles recourbées vers le haut : la perte de fonction de l'un ou de l'autre de ces gènes abolit le

phénotype chez les mutants *clf* et les lignées *35S::ULT1* (Goodrich et al., 1997; Lopez-Vernaza et al., 2012; Carles and Fletcher, 2009).

Pour rappel, deux fonctions biologiques ont été proposées pour les déméthylases ELF6, REF6 et JM13 : d'une part l'activation de gènes cibles spécifiques, et de l'autre la restriction spatiale de l'activité PRC2 afin d'éviter la propagation des marques H3K27me3 au niveau de gènes adjacents aux cibles du PRC2 (Crevillén, 2020). Or, contrairement aux HDMT, ULT1 ne cible pas spécifiquement les domaines adjacents aux cibles PRC2 (Julia Engelhorn et al., non publié ; **Figure 20-A-B**). C'est donc dans le contexte de l'activation de gènes développementaux plutôt que dans celui de la restriction spatiale de la marque qu'ULT1 et les HDMTs pourraient agir de concert. De plus, tandis que les gènes cibles de CLF pour l'activation sont sur-représentés parmi les 916 cibles de ULT1 pour l'activation par rapport à l'ensemble des gènes de *A. thaliana* d'une façon statistiquement significative (638 gènes sur 916, $p\text{-value} = 9,1 \times 10^{-180}$), les gènes cibles des HDMTs sont au contraire sous-représentés parmi les cibles d'ULT1 pour l'activation. En effet, seulement 45 gènes sont à la fois cibles pour l'activation par ULT1 et par les HDMT. (**Figure 20-C**). Cependant, ULT1 et les 3 HDMTs pourraient agir de concert pour les gènes qu'ils régulent en commun, en particulier les gènes MADS comme *AP3*, *SEP3* et *AG* : ULT1 pourrait soit stabiliser la liaison entre les protéines JM1 et l'ADN des séquences cibles et ainsi améliorer le temps de résidence aux *loci* cibles, soit stimuler leur activité catalytique.

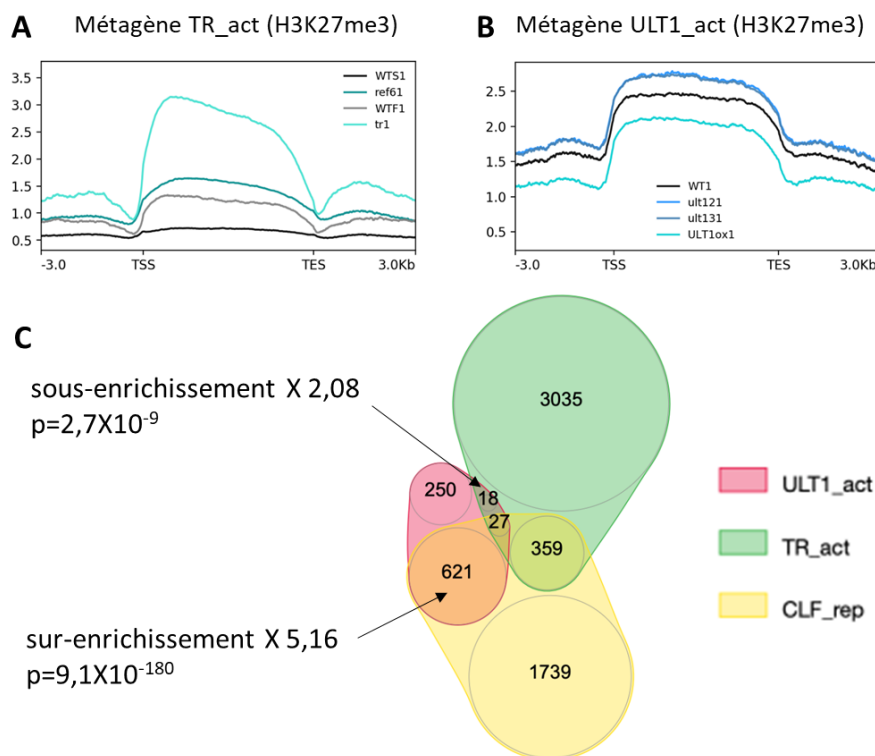


Figure 20 : Interactions entre ULT1 et les déméthylases JM1, REF6, ELF6 et JM13, déduites de données épigénomiques (ChIP-seq sur la marque H3K27me3). (A) Métagène pour les cibles activées par les trois déméthylases REF6, ELF6 et JM13, avec la représentation du niveau des marques H3K27me3 dans les plantules sauvages (WTS1), des inflorescences sauvages (WTF1) des plantules *ref6-3* (*ref61*) et des inflorescences chez le triple mutant *elf6-3 ref6^c jmj13^G* (*tr1*). (B) Métagène pour les

cibles activées par ULT1, avec la représentation du niveau des marques H3K27me3 chez des plantules dans les fonds sauvage (WT1), mutant *ult1-2* (*ult121*), mutant *ult1-3* (*ult131*) et *35S::ULT1* (ULT1ox). (C) Diagramme de Venn, représentant les recouvrements entre les listes des gènes cibles d'ULT1 pour l'activation (ULT1_act), des trois HDMTs REF6, ELF6 et JMJ13 pour l'activation (TR_act) et de CLF pour la répression (CLF_rep). Analyses réalisées à partir des données ChIP-seq H3K27me3 de l'équipe pour ULT1 et des données de (Yan et al., 2018) pour les HDMTs et de (Shu et al., 2019) pour CLF. Les p-values ont été calculées avec un test hypergéométrique, en prenant pour taille d'échantillon $s=33602$, correspondant au nombre total de gènes annotés dans la base de données TAIR10.

Afin de tester l'hypothèse selon laquelle les déméthylases d'H3K27me3 et ULT1 seraient interdépendantes pour la dé-répression de leurs cibles communes, j'ai mis en place une approche génétique. Le principe de cette approche est de tester les effets de la surexpression d'un facteur dans un contexte de perte-de-fonction de l'autre facteur. Si le facteur muté est requis pour la fonction du facteur surexprimé, on s'attend à une perte des effets de la surexpression dans ce contexte.

III-A-1-i ULT1 active ses cibles indépendamment de REF6

Analyse phénotypique

Afin de tester l'hypothèse selon laquelle REF6 serait nécessaire pour l'activation de cibles par ULT1, des plantes sauvages Col-0 et mutantes *ref6-3* ont été transformées avec une construction permettant l'expression de la séquence codante d'ULT1 sous le promoteur 35S (*35S::ULT1*). (**Figure 21-A à C**). Parmi les 48 plantules T1 obtenues dans le fond sauvage, 18 (37,5%) présentaient des feuilles recourbées vers le haut, ainsi que 8 plantes parmi les 36 T1 (25%) obtenues dans le fond *ref6-3*. La proportion de T1 avec phénotypes de feuilles recourbées dans le fond *ref6-3* n'est pas significativement différente de celle obtenue dans le fond sauvage ($p=0,10$ avec un test hypergéométrique). Ceci indique que les phénotypes d'expression ectopique ULT1 se manifestent indépendamment de la présence d'une protéine REF6 pleinement fonctionnelle. Les **Figure 21-B** et **D** présentent des plantes représentatives des T1 présentant des phénotypes d'expression ectopique ULT1 dans les fonds Col-0 sauvage et *ref6-3*, respectivement. Comme indiqué par le nombre de feuilles de rosettes, les T1 *35S::ULT1* fleurissent statistiquement plus tôt que les plantes sauvages, et les T1 *35S::ULT1 ref6-3* fleurissent plus tôt que les mutants *ref6-3*. (**Figure 21-E**) : on observe donc ici les effets additifs de la mutation *ref6* et de l'expression ectopique *ULT1* sur le temps de floraison. L'ensemble de ces résultats indique que *REF6* n'est pas requis pour les phénotypes d'expression ectopique ULT1.

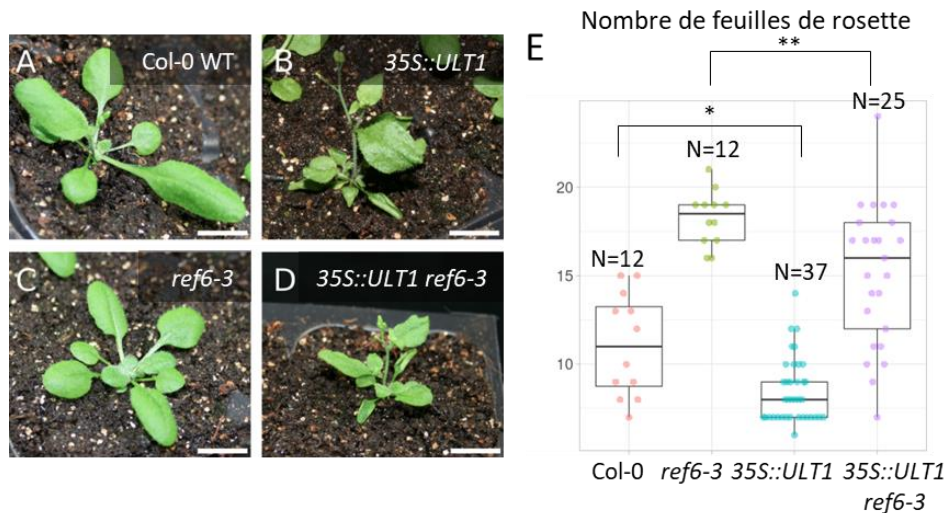


Figure 21 : REF6 est dispensable pour les phénotypes d'expression ectopique ULT1. (A) Plantes Col-0, (B) Plante T1 transformés avec une construction surexpresser 35S::ULT1 dans le fond Col-0, (C) mutant ref6-3, (D) Plante T1 transformés avec une construction surexpresser 35S::ULT1 dans le fond ref6-3. Les phénotypes d'expression ectopique ULT1 (floraison précoce et feuilles de rosette recourbées vers le haut) sont visibles dans le fond sauvage comme dans le fond ref6-3. (E) nombre de feuilles de rosette chez des T1 indépendantes 35S::ULT1 dans des fonds Col-0 et ref6-3 et des plantes non transformées Col-0 et ref6-3. Des tests de Student ont été effectués pour déterminer la significativité de la différence des moyennes entre différents génotypes. Barre d'échelle : 1cm.

J'ai également entrepris une approche similaire en introduisant le transgène 35S::ULT1 dans le fond ref6 par croisement plutôt que par transformation directe. J'ai souhaité utiliser l'allèle nul ref6^C plutôt que l'allèle hypomorphe ref6-3. En effet, ref6-3 permet la production d'une protéine tronquée qui possède un domaine catalytique fonctionnel mais est dépourvue des doigts de Zinc C2H2, et les phénotypes ref6-3 sont moins marqués que ceux de ref6^C (Yan et al., 2018) (**Figure 19**).

L'approche de croisement génétique procure l'avantage de permettre de comparer la force des phénotype des surexpression dans différents fonds génétiques portant tous le même transgène, inséré dans la même région génomique. Dans ce but, j'ai croisé une plante 35S::ULT1 Col-0 (lignée 4-1, obtenue précédemment par Julia Engelhorn) avec un mutant nul ref6^C (**Figure 22-A**).

J'ai ensuite comparé, après génotypage, les phénotypes de plantes WT, ref6^C, 35S::ULT1 et 35S::ULT1 ref6^C issues de ce croisement.

Au fil des générations (F1 → F3), j'ai constaté la perte des phénotypes d'expression ectopique 35S::ULT1 précédemment observés sur la lignée parentale du croisement. En génération F3, il devient ainsi difficile de distinguer les phénotypes de plantes 35S::ULT1 de ceux de plantes sauvages, dans un fond sauvage Col-0 comme dans un fond mutant ref6^C (**Figure 22-B à E**). Cette perte de phénotype de la lignée 35S::ULT1 ne permet donc pas de se baser sur la simple observation du développement des plantes pour déterminer le rôle de REF6 dans l'activation des cibles par ULT1.

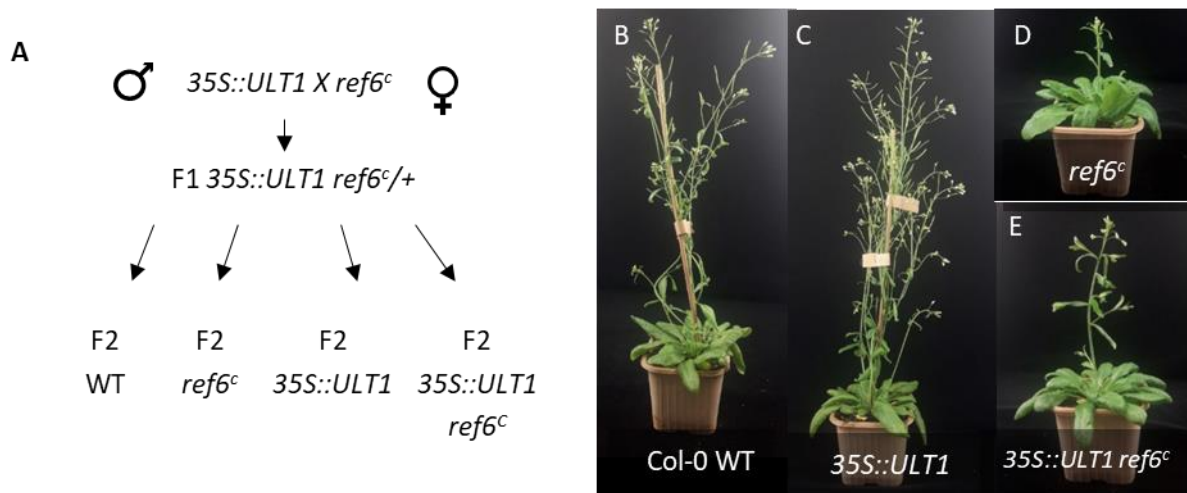


Figure 22 : Obtention par croisements de lignées *35S::ULT1* et *35S::ULT1 ref6^c*. (A) Croisement réalisé pour l'obtention de lignées d'expression ectopique *ULT1* dans les fonds sauvage et *ref6^c*, avec le transgène inséré au même *locus*. (B) à (E) Plantes F3 *ref6^c* x *35S::ULT1* âgées de 41 jours. Les phénotypes de surexpression *ULT1* ne sont observables ni dans le fond sauvage ni dans le fond *ref6^c*.

Afin d'étudier l'effet de la fonction déméthylase d'H3K27me3 dans son ensemble sur l'activation de gènes cibles par *ULT1*, j'ai croisé des plantes *35S::ULT1* (lignée 4-1) avec des triples mutants *elf6-3 ref6^c jmj13^G* (**Figure 23**). Dans ce contexte j'ai également observé une perte des phénotypes de surexpression *ULT1* dans la descendance F4 : les plantes *35S::ULT1* sont similaires aux plantes sauvages et les plantes *elf6-3 ref6^c jmj13^G* sont similaires aux plantes triple mutantes *elf6-3 ref6^c jmj13^G* (plantes naines, siliques déformées).



Figure 23 : Phénotypes de plantes F5 issues du croisement *elf6-3 ref6^c jmj13^G* X *35S::ULT1*. Photos prises sur des plantes cultivées en jours longs, 42 jours post-germination. Les plantes *35S::ULT1* ne présentent pas de phénotype d'expression ectopique *ULT1* ni dans le fond sauvage, ni dans le fond triple mutant. Les plantes *elf6-3 ref6^c jmj13^G* et *35S::ULT1 elf6-3 ref6^c jmj13^G* sont phénotypiquement indiscernables. Barre d'échelle : 6 cm.

Analyse moléculaire

L'observation phénotypique des plantes ne permettant pas de répondre pleinement à la question posée, j'ai décidé de pousser l'analyse au niveau moléculaire. J'ai cherché à comparer les niveaux d'expression de gènes cibles pour l'activation par *ULT1* chez les plantes entières issues des croisements précédents. J'ai réalisé pour cela des expériences de RT-qPCR

sur des plantes F3 de 7 jours, issues du croisement *ref6^C* X *35S::ULT1*, et j'ai comparé les niveaux d'expression de gènes homéotiques floraux pour les quatre génotypes suivants : sauvage, *35S::ULT1*, *ref6^C* et *35S::ULT1 ref6^C*. (**Figure 24**). Les résultats montrent que bien que les phénotypes de surexpression *ULT1* ne soient pas clairement observés dans ces populations, *ULT1* est surexprimé 10 à 20 fois dans les plantules *35S::ULT1* et *35S::ULT1 ref6^C* par rapport au niveau endogène chez le sauvage. On peut également observer une dérépression des gènes homéotiques floraux *AP3*, *SEP3* et *AG* d'un facteur 3 à 10 par rapport aux niveaux observés chez le contrôle pour ces deux génotypes. *REF6* n'est donc pas indispensable à l'activation de ces trois gènes cibles dans les plantules qui expriment *ULT1* ectopiquement.

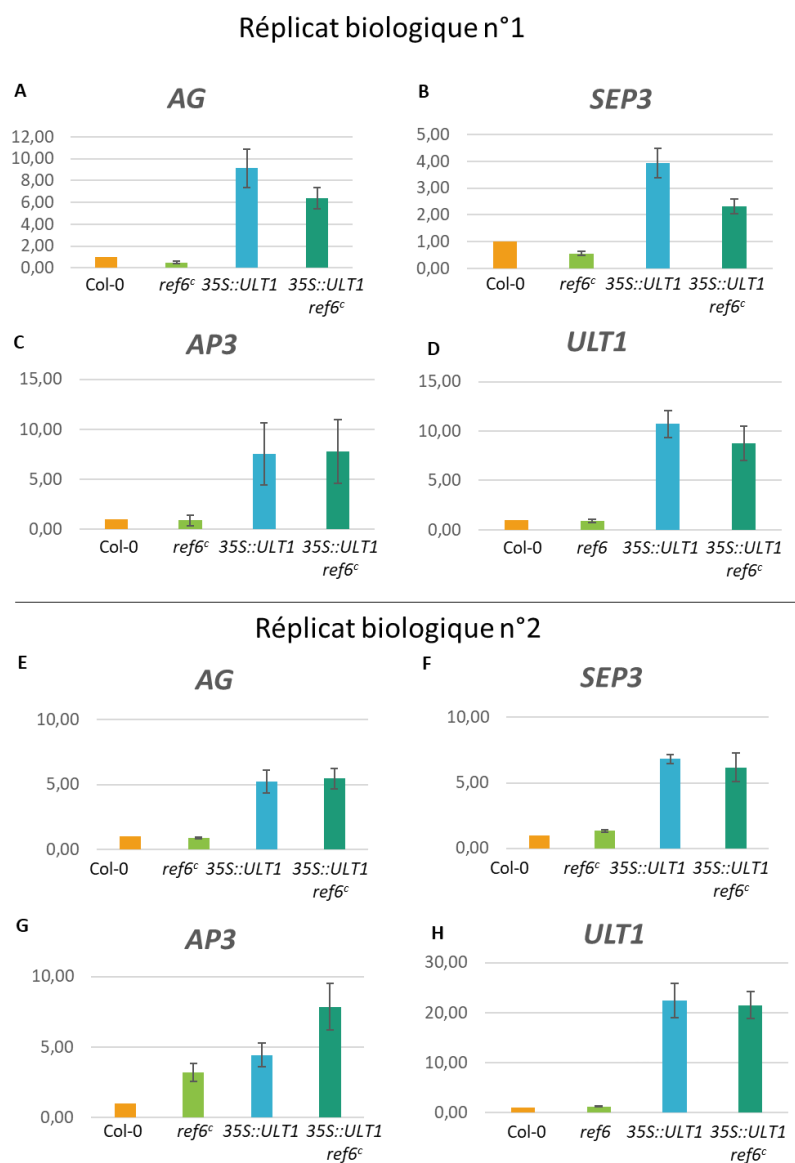


Figure 24 : REF6 n'est pas requis pour la dé-répression des gènes MADS floraux par ULT1. (A-H) : Niveaux relatifs d'expression des gènes floraux homéotiques *AP3*, *AG*, *SEP3* et d'*ULT1* dans des plantules F3 *ref6^C* x *35S::ULT1* âgées de 7 jours, évalués par deux expériences indépendantes de RT-qPCR. Les niveaux d'expression des gènes cibles ont été normalisés avec le gène de référence *MON1* (Dekkers et al., 2012). Les barres d'erreur correspondent aux erreurs standard pour 2 à 3 réplicats techniques.

Afin de déterminer si la fonction déméthylase d'H3K27me3, dans sa globalité, était requise pour l'activation ectopique des gènes homéotiques floraux, j'ai tenté de mettre en place une approche moléculaire analogue à celle présentée ci-dessus, sur la descendance du croisement *elf6-3 ref6^c jmj13^G X 35S::ULT1*. Des difficultés techniques liées à la fécondité très réduite des triples mutants ont empêché de mener ces travaux jusqu'au bout. Les résultats obtenus dans cette partie ne permettent donc pas de conclure sur le rôle global des trois déméthylases H3K27me3 (REF6, ELF6 et JMJ13) dans l'activation par ULT1 des gènes homéotiques floraux.

Il faut noter que les phénotypes d'expression ectopique *ULT1* sont plus marqués dans l'écotype Ler que dans l'écotype Col-0. Le travail précédent a cependant été réalisé dans l'écotype Col-0 car les allèles mutants *hdmt* étaient disponibles dans cet écotype.

J'ai comparé les niveaux d'expression d'*ULT1* et des gènes homéotiques floraux chez les plantules sauvages Ler et Col-0, et chez deux lignées d'expression ectopique *ULT1* dans les fonds Ler et Col-0 (**Figure 25**). On constate que, pour un niveau d'expression *ULT1* comparable, l'expression des gènes homéotiques floraux induite par *ULT1* est plus forte dans le fond Ler que dans le fond Col-0. Les niveaux d'expression d'*AP3*, *AG* et *SEP3* dans la lignée *35S::ULT1 4-1* (Col-0) sont supérieurs aux niveaux observés chez Col-0 sauvage, mais sont similaires aux niveaux observés chez Ler sauvage. Le niveau d'expression ectopique des gènes homéotiques floraux dans les plantules *35S::ULT1 4-1* (Col-0) serait donc insuffisant pour conférer des phénotypes de feuilles recourbées vers le haut.

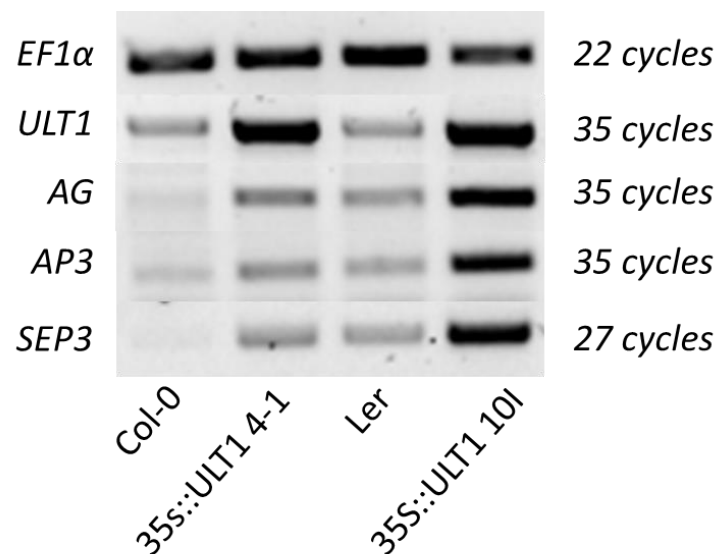


Figure 25 : Les niveaux d'expression des gènes homéotiques floraux, induits par une expression ectopique de *ULT1* dans les plantules, sont plus importants dans la lignée *35S::ULT1 10I* (écotype Ler) que dans la lignée *35S::ULT1 4-1* (écotype Col-0). RT-PCR réalisées sur des plantules de 8 jours : plantules sauvages Col-0 et Ler, et lignées transgéniques *35S::ULT1 4-1* dans le fond Col-0 et *35S::ULT1 10I* dans le fond Ler. Le gène *EF1α* a été utilisé comme référence pour vérifier l'équilibre des échantillons.

III-A-1-ii REF6 dé-réprime ses cibles indépendamment d'ULT1

Analyse phénotypique

Afin de tester l'hypothèse selon laquelle la fonction ULT1 serait requise pour l'activation de cibles par REF6, une approche analogue à celle décrite dans la sous-partie précédente a été menée. Des plantes sauvages Ler ou mutantes *ult1-3* (lignée ADN-T KO, **Figure 26**) ont été transformées avec une construction contenant la séquence codante *REF6* fusionnée à celle de la protéine YFP suivie d'une étiquette HA sous le promoteur 35S (*35S::REF6-YFP-HA*). Plusieurs plantes T1 présentant des phénotypes de surexpression *REF6* (taille de rosette réduite, feuilles recourbées vers le haut, floraison précoce) ont pu être obtenues dans le fond sauvage comme dans le fond mutant (**Figure 27**). ULT1 n'est donc pas requis pour les phénotypes de surexpression REF6.

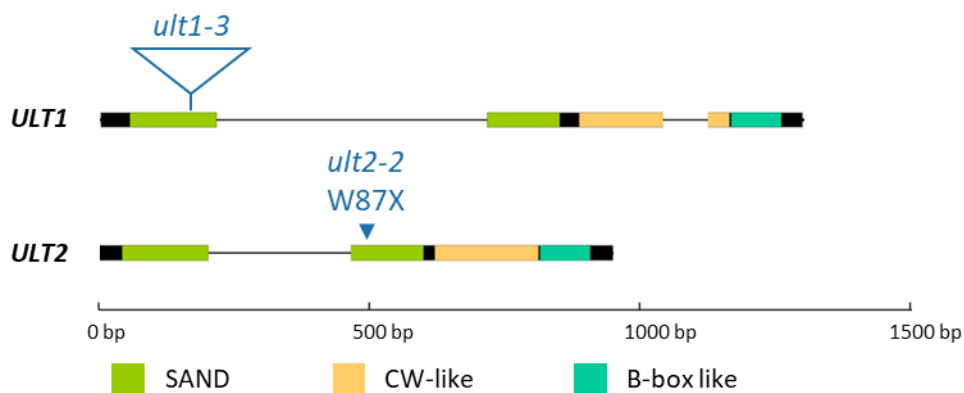


Figure 26 : Description des allèles utilisés pour les mutants *ult1* et *ult2*. L'allèle T-DNA *ult1-3* (SALK 074642, décrit dans (Carles et al., 2005) présente une insertion au niveau du domaine SAND. L'allèle EMS *ult2-2*, décrit dans (Monfared et al., 2013) présente une mutation faux-sens au niveau de l'acide aminé 87, aboutissant à la production d'une protéine tronquée. Ces deux allèles sont des allèles nuls.

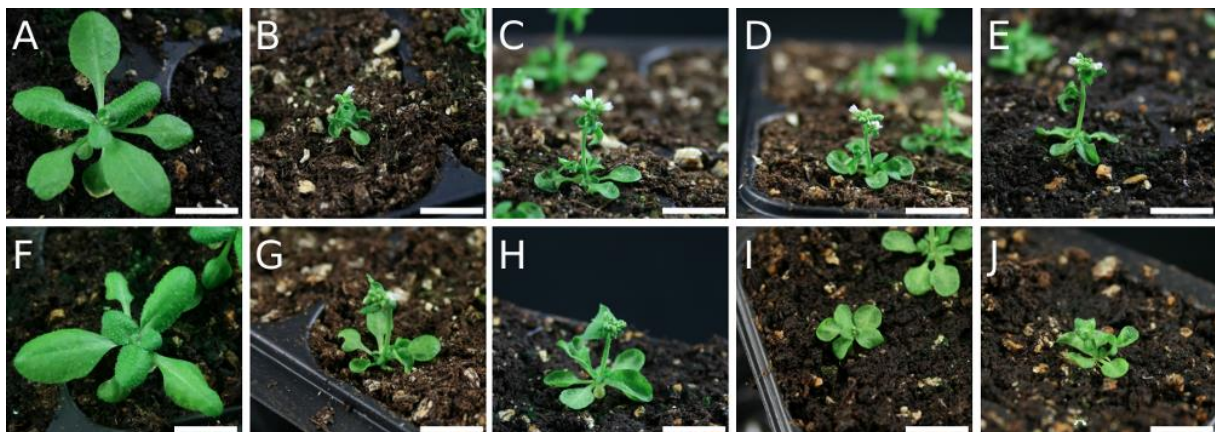


Figure 27 : ULT1 n'est pas requis pour les phénotypes de surexpression REF6. (A) Plantes Ler sauvage et (B-E) T1 transformées avec une construction *35S::REF6-YFP-HA* dans un fond sauvage présentant des phénotypes de surexpression *REF6* : floraison précoce et feuilles recourbées vers le haut. (F) Plantes *ult1-3* et (G-J) T1 transformées avec une construction *35S::REF6-YFP-HA* dans un fond *ult1-3*, présentant des phénotypes de surexpression REF6.

Pour comparer l'effet de la surexpression *REF6* induite par un transgène inséré au même *locus* dans les fonds sauvage et *ult1-3*, j'ai croisé une plante *35S::REF6-YFP-HA ult1-3* (Lignée 44-4, obtenue précédemment par Julia Engelhorn) avec une plante sauvage (**Figure 28-A**), et j'ai comparé les phénotypes de F5 issues de ce croisement de génotype sauvage, *ult1-3*, *35S::REF6-YFP-HA* et *35S::REF6-YFP-HA ult1-3* (**Figure 28-B à E**).

Les plantes *35S::REF6-YFP-HA* présentent des feuilles recourbées vers le haut, dans le fond sauvage comme dans le fond *ult1-3*, mais des différences phénotypiques sont observées entre ces deux populations de plantes. Les plantes *35S::REF6-YFP-HA ult1-3* sont plus grandes et présentent une tige plus large que les plantes *35S::REF6-YFP-HA* dans le fond sauvage (**Figure 28-D et E**). Ces différences pourraient être expliquées par la production de davantage de cellules par les méristèmes apicaux élargis chez les plantes *ult1-3* (Carles et al., 2005). Bien que de tels phénotypes ne soient pas observables dans un fond sauvage, ils sont révélés dans le contexte de surexpression de *REF6*.

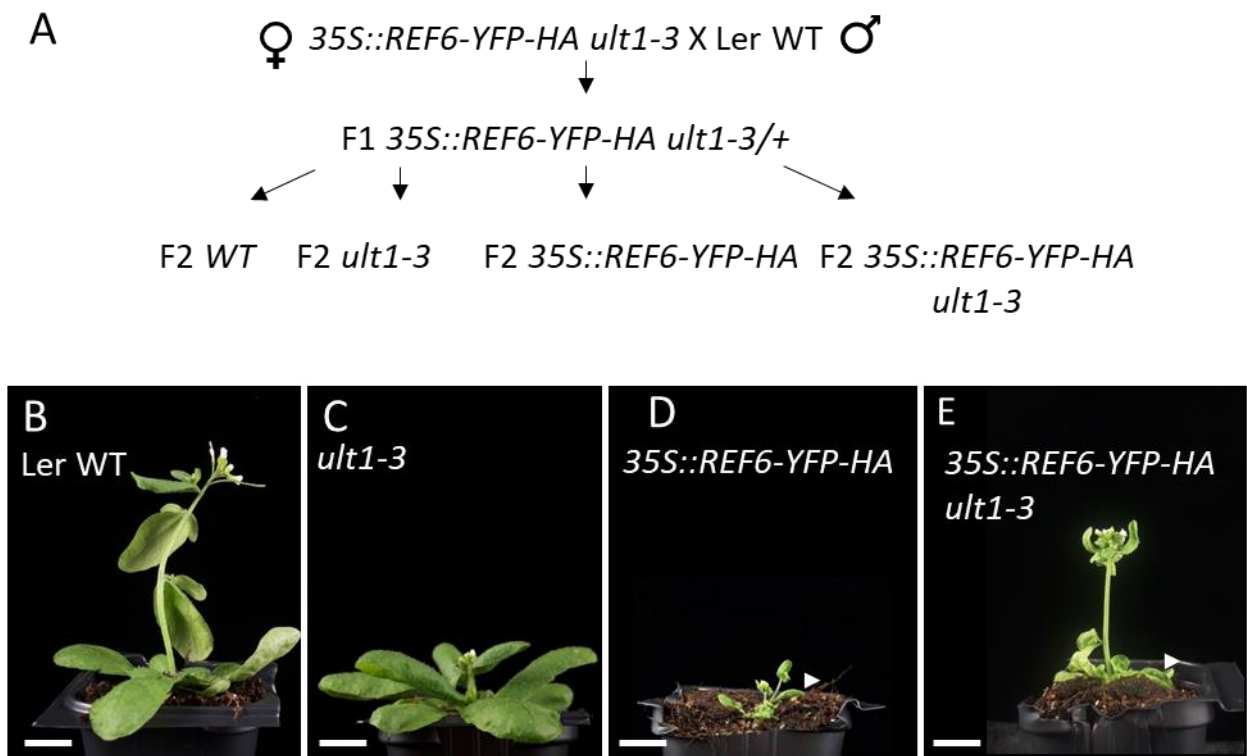


Figure 28 : ULT1 n'est pas requis pour les phénotypes d'expression ectopique *REF6*. (A) : Croisement réalisé pour l'obtention de lignées surexprimant *REF6* dans un fond sauvage et *ult1-3* avec le transgène inséré au même *locus*. (B) à (E) : Plantes F5 Ler X *35S::REF6-YFP-HA ult1-3* âgées de 31 jours. Des feuilles recourbées vers le haut, indiquées par des têtes de flèches, sont présentes chez les plantes *35S::REF6-YFP-HA* dans un fond sauvage comme dans un fond mutant *ult1-3*. Barres d'échelle : 1cm

J'ai ensuite effectué des quantifications de temps de floraison pour ces plantes (**Figure 29**). Les plantes *35S::REF6-YFP-HA ult1-3* fleurissent précocement par rapport aux plantes *ult1-3*, de la même manière que les plantes *35S::REF6-YFP-HA* fleurissent précocement par rapport aux plantes Ler sauvages. Il y a donc un effet additif du gain de fonction *REF6* et de la perte de

fonction *ult1* concernant les temps de floraison. Ceci indique également une action indépendante entre REF6 et ULT1.

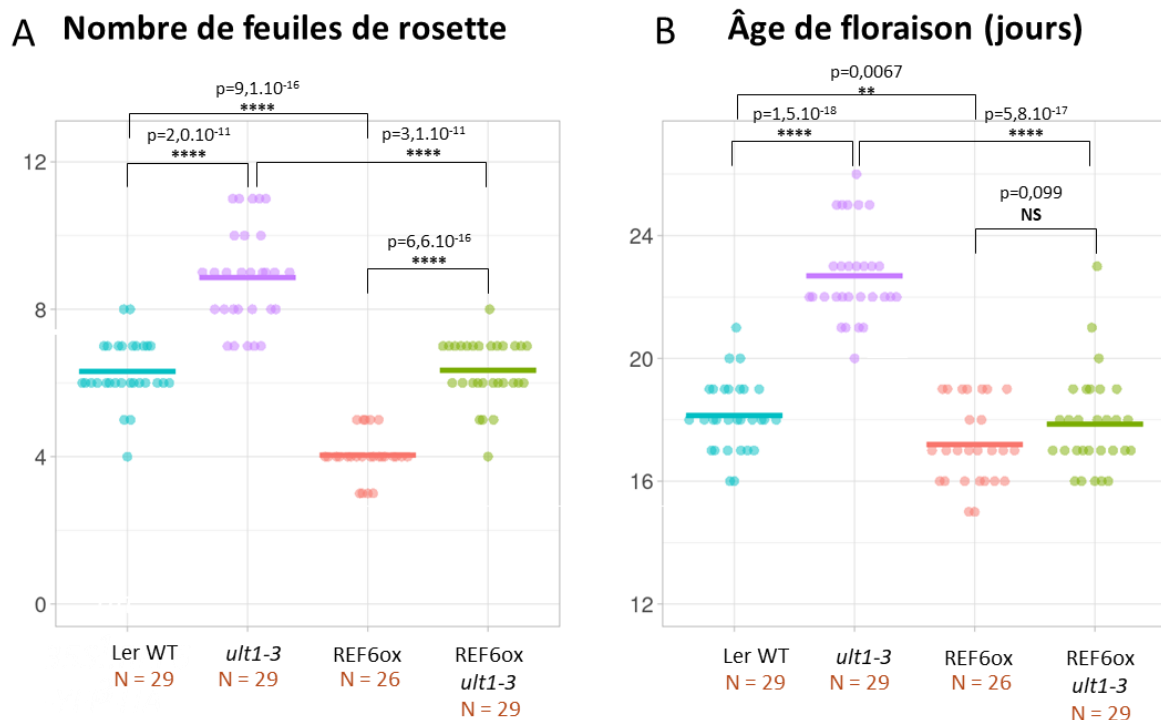


Figure 29 : ULT1 n'est pas requis pour le phénotype de floraison précoce induit par l'expression ectopique de REF6. (A) : Nombre de feuilles de rosette et (C) âge à floraison pour des plantes F5 Ler X *35S::REF6-YFP-HA ult1-3*, cultivées en jours longs. Les p-values ont été calculées par un test de Student bilatéral. La présence du transgène *35S::REF6-YFP-HA* est notée REF6ox.

Analyse moléculaire

Afin de quantifier les niveaux d'expression des gènes homéotiques floraux dans ces quatre fonds génétiques, j'ai ensuite réalisé des expériences de RT-PCR sur les plantes F5 issues du croisement *ult1-3* X *35S::REF6-YFP-HA* : Ler, *ult1-3*, *35S::REF6-YFP-HA* et *35S::REF6-YFP-HA ult1-3*. Deux réplicats biologiques sont présentés en **Figure 30**. Ces expériences ont permis de détecter la surexpression de *REF6* par un facteur de 20 à 40 par rapport au sauvage. L'expression ectopique des gènes homéotiques floraux *AP3*, *SEP3* et *AG* a été également détectée systématiquement bien que son intensité varie entre le réplicat 1 (**Figure 30-A-D**) et le réplicat 2 (**Figure 30-E-F**). Ces résultats montrent donc qu'ULT1 n'est pas indispensable pour l'activation des gènes floraux homéotiques par l'expression ectopique de *REF6*.

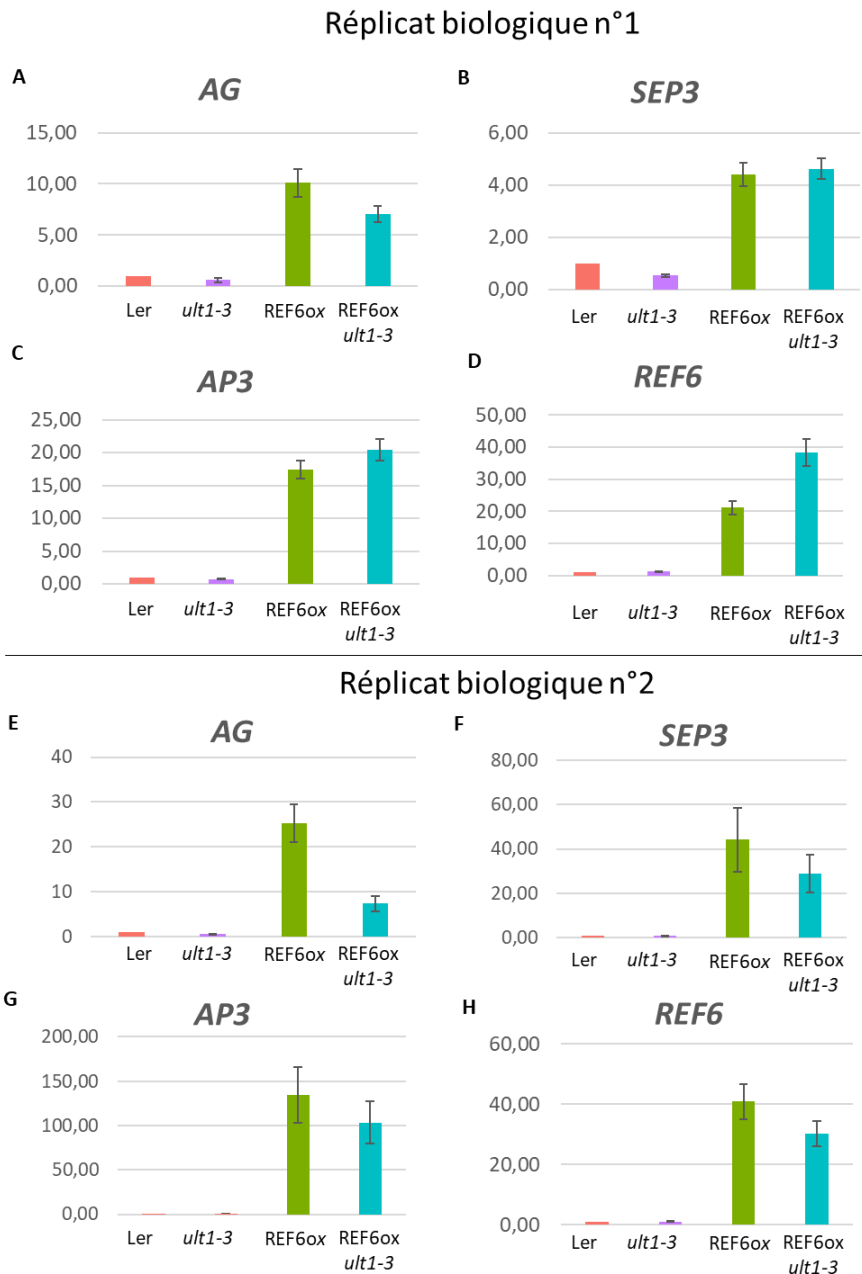


Figure 30 : ULT1 n'est pas requis pour la dé-répression des gènes homéotiques floraux par REF6 (A) à (H) : Niveaux relatifs d'expression des gènes floraux homéotiques *AP3*, *AG*, *SEP3* et de *REF6* obtenus sur les plantules F5 Ler X *35S::REF6-YP-HA ult1-3* de 7 jours, évalués par deux expériences indépendantes de RT-qPCR. Les niveaux d'expression des gènes cibles ont été normalisés avec le gène de référence *MON1* (Dekkers et al., 2012). Les barres d'erreur correspondent aux erreurs standard pour 2 à 3 réplicats techniques.

ULT1 et ULT2 étant fonctionnellement redondants (Monfared et al, 2013), on pourrait postuler que l'activation des cibles par REF6 pourrait passer par ULT2, expliquant ainsi l'absence d'effet d'une perte de fonction d'ULT1 seul sur l'activation de cibles par REF6. Cette hypothèse paraît cependant peu probable car des analyses d'hybridation ARN *in situ* et de RT-PCR ont permis de détecter l'expression d'ULT1 mais pas d'ULT2 dans des plantules et autres tissus végétatifs (Carles et al., 2005). Afin de tester tout de même l'hypothèse selon laquelle la fonction ULT dans son ensemble serait requise pour l'activation de cibles par REF6, le

transgène *35S::REF6-YFP-HA* pourrait être introduit par croisement dans un fond double mutant nul *ult1-3 ult2-2*, et un travail analogue à celui présenté précédemment pourrait être effectué sur la descendance du croisement.

Les résultats précédents montrent donc, par une approche de génétique moléculaire, qu'ULT1 n'est pas requis pour l'activation de gènes par REF6 et réciproquement : le mode d'action d'ULT1 est principalement indépendant de REF6, au moins en conditions de surexpression, ce qui est en cohérence avec le fait qu'*ULT1* soit principalement exprimé dans des tissus en prolifération, tels que les méristèmes, dans lesquels la marque H3K27me3 peut être diluée au cours des divisions cellulaires sans qu'il y ait besoin de catalyser son retrait actif. La protéine ULT1 fonctionne donc peut-être en limitant le maintien de la marque H3K27me3 par le complexe PRC2. C'est le scénario que nous allons aborder dans la partie suivante.

III-A-2 Interactions physiques entre ULT1 et le complexe PRC2

L'inhibition du complexe PRC2 par ULT1 pourrait permettre une dé-répression de gènes cibles par une dilution passive des marques H3K27me3 au cours des cycles de division cellulaire. Le fait que de nombreuses cibles d'ULT1 soient exprimées dans des tissus méristématiques, donc en division active, est compatible avec cette hypothèse. De plus les protéines PcG interagissent physiquement et génétiquement avec des protéines qui font partie de la machinerie de réplication ; c'est par exemple le cas de LHP1, qui interagit physiquement et génétiquement avec ENHANCER OF LHP1 (EOL1), une protéine chaperon impliquée dans la ré-incorporation des histones parentales au niveau du brin retardé : l'activité PcG et la réplication de l'ADN sont deux processus couplés l'un à l'autre. Les divisions cellulaires pourraient donc permettre des transitions d'une identité cellulaire à une autre, dans le cas où la transmission de la marque H3K27me3 est inhibée, ce qui peut permettre à des gènes de sortir de la répression PcG (Hugues et al., 2020).

Des expériences de cristallographie montrent que le complexe PRC2 animal peut interagir avec l'ADN nucléosomal et les queues d'histones H3 de deux nucléosomes adjacents : la sous-unité catalytique EZH1 interagit avec le nucléosome qui sert de substrat et la sous-unité à domaines WD40 EED interagit avec un nucléosome adjacent, ce qui peut activer de manière allostérique l'activité du PRC2 lorsque ce nucléosome adjacent porte la marque H3K27me3 (Poepsel et al., 2018).

Ainsi, l'interaction d'ULT1 avec CLF et SWN pourrait empêcher le dépôt des marques H3K27me3 par le PRC2 via plusieurs mécanismes possibles :

- ULT1 pourrait inhiber l'activité catalytique histone méthyltransférase des enzymes CLF et SWN au sein du complexe PRC2.
- ULT1 pourrait empêcher le complexe PRC2 de se lier à ses cibles (par reconnaissance de séquences PRE (Xiao et al., 2017) portées par l'ADN du promoteur et/ou via des longs ARN non codants produits au niveau des cibles (Heo and Sung, 2011; Wu et al., 2018)). Un tel mécanisme anti-PRC2 a déjà été décrit dans le cadre de l'activation de *KNU* par AG (Sun et al., 2014). Comme le recrutement du PRC2 par des PRE fait intervenir des interactions entre complexe PRC2 et facteurs de transcription (Godwin

and Farrona, 2022), ULT1 pourrait empêcher le recrutement du complexe PRC2 en bloquant des interactions entre facteurs de transcription et complexe PRC2.

- L'activité du PRC2 étant régulée de façon allostérique par des interactions avec des queues d'histones (Bieluszewski et al., 2021), ULT1 pourrait avoir un impact sur ces interactions.
 - ULT1 pourrait empêcher l'activation allostérique du PRC2 par un nucléosome adjacent portant la marque H3K27me3, un mécanisme qui a été démontré à la fois pour le complexe PRC2 de la levure *Chaetomium thermophilum* (Jiao and Liu, 2015) et le complexe PRC2 humain (Justin et al., 2016). Cette activation allostérique pourrait jouer un rôle dans la transmission de la marque H3K27me3 au cours des cycles de réplication de l'ADN et l'inhibition de cette activation pourrait au contraire permettre la perte de la marque H3K27me3 au cours des divisions cellulaires (Hugues et al., 2020).
 - ULT1 pourrait empêcher soit le contact entre la sous-unité à domaine WD40 MSI1 et l'acide aminé H3K4 non méthylé de la queue d'histone qui sert de substrat, soit le contact entre la sous-unité catalytique CLF/SWN et l'acide aminé H3K36 non méthylé sur cette même queue d'histones. En effet, il a été démontré chez l'animal que les contacts PRC2-H3K4me0 et PRC2-H3K36me0 permettent une activation allostérique du complexe PRC2, sans avoir d'influence sur la force de la liaison entre le PRC2 et son substrat (Finogenova et al., 2020; Schmitges et al., 2011). La perte de cette activation allostérique pour les nucléotides portant les marques H3K4me3 ou H3K36me3 permet en effet d'expliquer pourquoi le complexe PRC2 est inhibé par les marques activatrices.
- ULT1 pourrait inhiber l'assemblage du complexe cœur PRC2 : en effet, chez l'animal, les sous-unités portant la fonction méthyltransférase ont besoin d'être assemblées au domaine VEFS des homologues de EMF2/VNR2 et à l'homologue de FIE pour présenter une activité catalytique mesurable *in vitro* (Jiao and Liu, 2015).

Comme mentionné précédemment, ULT1 interagit physiquement avec CLF et SWN *in vivo*. J'ai donc cherché à cartographier les domaines protéiques d'ULT1, CLF et SWN impliqués dans leurs interactions physiques. L'identification précise des domaines impliqués dans cette interaction devrait permettre de mettre en œuvre des expériences *in vivo* et/ou *in vitro* en vue de tester les hypothèses décrites ci-dessus sur les mécanismes d'action d'ULT1 pour l'inhibition du complexe PRC2.

III-A-2-i Domaines protéiques récemment identifiés et caractérisés pour ULT1, et utilisés pour les tests d'interaction avec CLF et SWN.

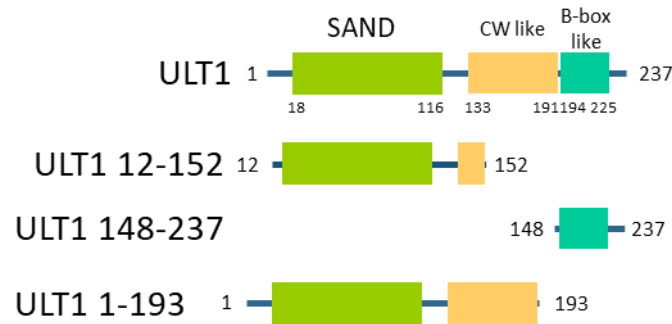


Figure 31 : Constructions utilisées pour la cartographie des domaines d'ULT1 impliqués dans les interactions physiques avec CLF et SWN.

Domaine SAND

L'analyse de la séquence primaire d'ULT1 et de son paralogue ULT2 révèle la présence d'un domaine SAND situé en partie N-terminale (acides aminés 18 à 116 de ULT1). Le domaine SAND est fréquemment porté par des protéines multi-modulaires qui présentent également des domaines capables de lire des marques épigénétiques (tels que le domaine PHD ou le bromodomaine), et/ou des domaines impliqués dans les interactions protéine-protéine (tels que les domaines hélice-boucle-hélice), qui jouent un rôle dans la régulation transcriptionnelle (Bottomley et al., 2001). La capacité de ces domaines à lier l'ADN de façon séquence-spécifique a été démontrée pour certaines protéines animales comme la protéine NUDR qui se lie à des répétitions du motif TTC(C/G)G (Michelson et al., 1999)). La structure du domaine SAND de la protéine animale Sp100b a été résolue : la surface de contact entre son domaine SAND et l'ADN implique 4 acides aminés KDWK conservés (Bottomley et al., 2001). Le domaine SAND d'ULT1 présente une affinité pour l'ADN démontrée par EMSA (C. Carles, données non publiées). Aucun motif spécifique de reconnaissance pour ULT1 n'avait pu être identifié jusqu'à récemment par expérience de SELEX ou de CHIP-seq. De plus, des expériences d'EMSA réalisées sur la protéine OsULT1 de Riz ont montré que son domaine SAND pouvait lier spécifiquement un motif GAGAG dans le gène *OsDREB1b* (Roy et al., 2019). Récemment, V. Geshkovski dans l'équipe (travaux de thèse en cours) a montré par EMSA que la protéine ULT1 d'*A. thaliana* se lie à des séquences régulatrices situées dans le grand intron d'AG, et correspondant à une région identifiée précédemment par CHIP-PCR avec une protéine ULT1 tagguée (Carles & Fletcher, 2009). La séquence d'AG liée par ULT1 contient également des motifs GAGAG, qui sont connus pour être des Polycomb Reponse Elements (PREs), c'est à-dire qu'ils permettent le recrutement du complexe PRC2, chez la Drosophile comme chez *A. thaliana* (Müller and Kassis, 2006; Xiao et al., 2017). Le domaine SAND est indispensable à la fonction d'ULT1 : en effet, une construction *35S::ULT1m*, dans laquelle *ULT1* est muté pour les 4 acides aminés « KDWK » du domaine SAND, ne permet pas de restaurer le phénotype des mutants *ult1*, contrairement à une construction contenant la version sauvage de *ULT1* (C. Carles, données non publiées).

Domaine CW-like

Le logiciel d'intelligence artificielle AlphaFold (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2022) prédit que les résidus 133 à 191 d'ULT1 forment un domaine CW-like, qui a été confirmé expérimentalement au sein de l'équipe par des expériences de cristallographie du domaine C-terminal de ULT1 (J-B Izquierdo, travaux de thèse en cours non publiés). Les domaines CW sont des domaines présents chez plusieurs acteurs chromatinien et/ou régulateurs transcriptionnels chez les animaux comme chez les plantes (Perry and Zhao, 2003). Un domaine CW est présent par exemple chez la méthyltransférase d'H3K36 ASHH2/SDG8 (Zhao et al., 2005) et les facteurs de transcription VAL1 et VAL2 (Suzuki et al., 2007). Ces domaines sont capables de reconnaître et de lier des queues d'histones méthylées en H3K4. Les degrés de méthylation sur H3K4 qui peuvent être reconnus sont variables d'un domaine CW à un autre. Par exemple le domaine CW d'ASHH2 reconnaît H3K4me1 et H3K4me2 tandis que celui de VAL2 reconnaît H3K4me2 et H3K4me3 (Hoppmann et al., 2011). La reconnaissance des peptides méthylés met en jeu une cage aromatique formée par des résidus tryptophane. Or, cette cage aromatique n'est pas conservée dans le domaine CW-like d'ULT1 : ULT1 ne reconnaît probablement pas ces peptides mais on peut faire l'hypothèse selon laquelle son domaine CW-like pourrait reconnaître des queues d'histone avec une spécificité différente (Hoppmann et al., 2011). Des tests de liaison d'ULT1 à des peptides fixés sur une matrice (MODSpec peptide array, Active Motif) ainsi que des expériences d'ITC (calorimétrie par titrage isotherme) sont en cours dans l'équipe (J-B Izquierdo), afin de déterminer une spécificité de substrat pour le domaine CW-like d'ULT1.

Domaine B-box like

Des homologies de séquence entre ULT1 et d'autres protéines indiquent que les acides aminés en position C-terminale d'ULT1 et ULT2 formeraient un domaine B-box-like. Les domaines B-box sont des domaines riches en cystéines qui coordonnent des atomes de zinc et semblent être impliqués dans des interactions protéine-protéine ou protéine-ARN chez les animaux comme les végétaux (Gangappa and Botto, 2014). Le domaine B-box-like de l'homologue d'ULT1 chez le riz est requis pour la multi-mérisation de la protéine, et peut lier l'ADN de façon séquence non-spécifique (Roy et al., 2019).

III-1-2-ii Domaines protéiques identifiés pour CLF et SWN

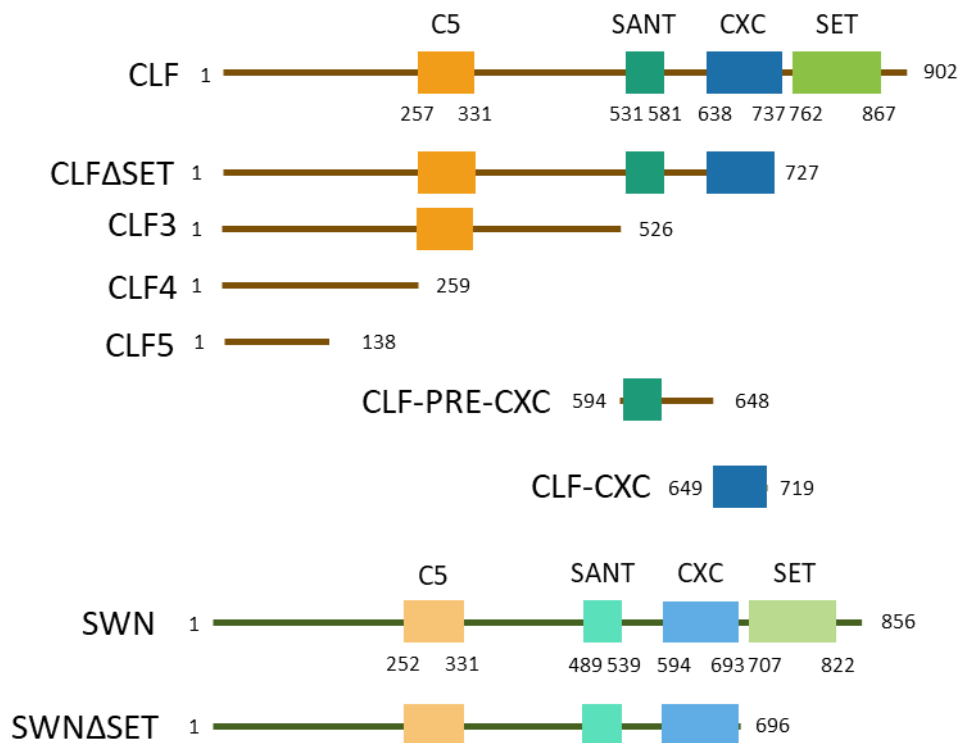


Figure 32 : Constructions utilisées au laboratoire pour la cartographie des domaines de CLF et SWN impliquées dans les interactions avec ULT1.

Les domaines suivants ont été décrits pour CLF et SWN (**Figure 32**) :

Domaine C5

Le domaine C5 est requis pour l'interaction physique entre CLF/SWN et le domaine VEFS d'EMF2/VRN2, indispensable pour conférer une activité catalytique au complexe (Chanvivattana et al., 2004). Le domaine C5 est le domaine le moins conservé entre CLF et SWN parmi les 4 domaines décrits (47% d'identité, contre 69% pour le domaine SANT, 80% pour le domaine CXC et 89% pour le domaine SET) (Shu et al., 2020).

Domaine SANT

Le domaine SANT est un domaine que l'on retrouve couramment sur des effecteurs chromatinien. Il est présent à la fois sur CLF et SWN, et sur les sous-unités SWI3 A/B/C qui forment des complexes remodeleurs de type SWI2/SNF2 avec BRM/SYD. Il permettrait un couplage entre la reconnaissance de queues d'histones et la stimulation de l'activité catalytique de la protéine qui le porte, en stabilisant la queue d'histone servant de substrat, dans une position qui favorise la catalyse (Boyer et al., 2004).

Domaine CXC

Le domaine CXC présent juste en position N-terminale du domaine SET, également appelé domaine pré-SET, permet la coordination de plusieurs ions Zn^{2+} par des cystéines, et est

conservé entre plusieurs méthyltransférases d'histone à domaine SET. Les domaines CXC de CLF et de ses homologues humains EZH1/2 présentent une affinité globale pour l'ADN simple brin. De plus, une interaction entre le domaine CXC de CLF et des ARN longs non codants introniques transcrits au niveau des *loci AG* et *FLC* a été démontrée, et cette interaction avec les lncRNAs permet la répression d'*AG* et de *FLC* (Heo and Sung, 2011; Wu et al., 2018). De plus, des expériences de cristallographie sur l'homologue humain EZH2 ont montré que des acides aminés du domaine CXC étaient en contact avec l'ADN enroulé autour du nucléosome qui sert de substrat pour le PRC2, et que des mutations de ce domaine causaient une perte d'affinité entre le complexe PRC2 et l'ADN, et une réduction de l'activité catalytique méthyltransférase (Finogenova et al., 2020)/

Domaine SET

Le domaine SET est présent chez les méthyltransférases d'histone et peut présenter des spécificités de substrat variées en fonction de l'enzyme considérée. Chez CLF/SWN, il porte l'activité catalytique histone méthyltransférase H3K27me3 (Ng et al., 2007). Tous les domaines précédemment cités sont évolutivement conservés et se retrouvent dans les homologues animaux de CLF et SWN (Sharaf et al., 2022).

III-A-2-iii CLF et SWN interagissent avec la partie N-terminale d'ULT1, en amont du domaine B-box-like

Afin de déterminer les régions d'ULT1, de CLF et de SWN requises pour les interactions physiques ULT1/CLF et ULT1/SWN, des expériences de cartographie d'interaction en double hybride de levure ont été mises en place au laboratoire. Le principe de ces tests d'interaction physique *in vivo* entre deux partenaires est d'exprimer le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription GAL4 (Noté BD) fusionné à l'un des partenaires, et le domaine d'activation transcriptionnelle de GAL4 (noté AD) fusionné à l'autre partenaire. En cas d'interaction physique entre les deux partenaires, le facteur de transcription GAL4 est « reconstitué » (par rapprochement des domaines BD et AD) et active l'expression de gènes de synthèse de l'adénine et de l'histidine, dont les séquences promotrices sont reconnues par le domaine BD, permettant ainsi leur transcription (grâce à l'activité AD). Les levures transformées peuvent alors croître sur un milieu dépourvu d'adénine et d'histidine ; on parle d'autotrophie de la levure pour ces deux acides aminés.

Des expériences en double hybride de levure réalisées précédemment au sein de l'équipe ont permis de cartographier les régions de CLF et SWN requises pour permettre une interaction physique avec ULT1. Les domaines d'interaction avec ULT1 (pleine longueur) ont ainsi pu être restreints aux 258 premiers acides aminés de CLF (en N-terminal du domaine C5, construction nommée CLF4) et aux 696 premiers acides aminés de SWN (en N-terminal du domaine SET, construction notée SWN Δ SET) (**Figure 32**). J'ai ensuite effectué un travail analogue afin de déterminer les régions d'ULT1 requises pour l'interaction physique avec CLF et SWN.

Les différentes versions tronquées d'ULT1 que j'ai utilisées sont les suivantes (**Figure 31**) :

- ULT1 1-193 : partie la plus N-terminale de la protéine, qui contient le domaine SAND et l'intégralité du domaine CW-like.

- ULT1 12-152 : contient le domaine SAND et les premiers acides aminés du domaine CW-like.
- ULT1 148-237 : partie la plus C-terminale de la protéine, qui contient le domaine B-box-like.

Puisque CLF pleine longueur donne un signal d'interaction positive avec ULT1 pleine longueur mais que ce n'est pas le cas de la construction SWN pleine longueur, j'ai choisi de tester par double hybride de Levure les interactions entre différentes versions tronquées d'ULT1 contre CLF pleine longueur d'une part et contre SWN Δ SET d'autre part.

Mes résultats montrent que la construction ULT1 1-193 est suffisante pour donner un signal d'interaction positive avec CLF, comme avec SWN Δ SET (**Figure 33**). La croissance des levures sur milieu sélectif est plus importante dans le cas de l'interaction ULT1 1-193-SWN Δ SET que dans le cas de l'interaction ULT1 1-193-CLF. Ceci peut indiquer soit que SWN Δ SET interagit plus fortement avec ULT1 1-193 que CLF, soit que la protéine tronquée SWN Δ SET est plus stable que CLF pleine longueur dans la levure. Des expériences de western blot effectués sur les levures transférées avec des anticorps dirigés contre CLF et SWN permettraient d'évaluer les niveaux d'accumulation de ces protéines.

Le domaine B-box-like semble ainsi dispensable pour l'interaction entre ULT1 et les HMT CLF et SWN. La construction contenant seulement le domaine B-Box-like ne semble pas suffisante pour médier l'interaction entre ULT1 et les HMT, mais elle permet cependant l'oligomérisation de ULT1 (**Figure 33**).

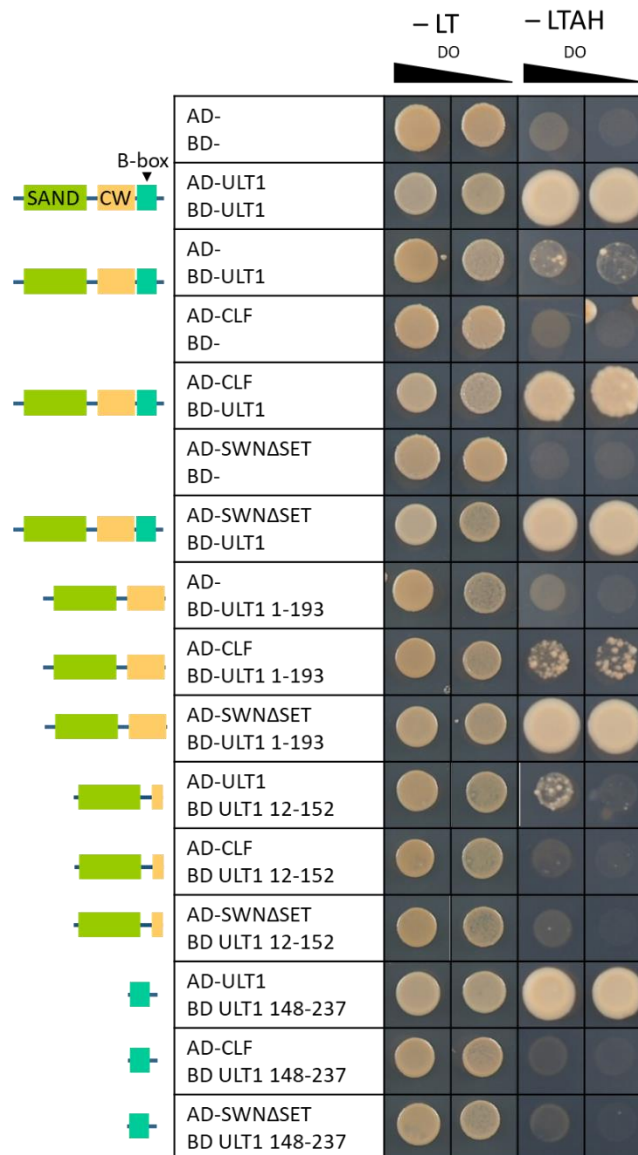


Figure 33 : Interactions entre différents domaines d'ULT1 et des méthyltransférases d'histone CLF et SWN. Les tests d'interaction en double hybride de Levure ont été réalisés sur des souches AH109 (AD) et Y187 (BD). Les photographies ont été prises après 7 jours de croissance de levures, à deux concentrations correspondant des densités optiques à 600 nm (DO) de 10 et 1. Les constructions BD-ULT1 12-252 et BD-ULT1 148-237 ne donnent pas de signal positif ni avec AD-CLF ni avec AD-SWNΔSET. L'interaction entre ULT1 et lui-même a été utilisée comme contrôle positif.

Pour affiner encore la cartographie des régions impliquées dans ces interactions, des constructions présentant seulement le domaine SAND ou seulement le domaine CW-like pourraient être clonées afin de tester s'ils sont suffisants pour permettre une interaction physique avec les deux HMTs CLF et SWN.

Les données de cartographie précédentes permettent de cerner plus précisément les domaines impliqués dans cette interaction. Les régions de CLF qui sont suffisantes pour médier une interaction physique ne correspondent pas à des domaines connus dont ULT1 pourrait inhiber la fonction par contact direct, et ne permettent donc pas de formuler des

hypothèses simples concernant les mécanismes par lesquels ULT1 pourrait inhiber l'activité de CLF et SWN.

L'interaction avec ULT1 pourrait cependant influencer sur la conformation et/ou l'activité d'un des domaines de CLF dont la fonction est connue, non pas par un contact physique direct avec ce domaine, mais via des effets allostériques. Des effets allostériques ont en effet déjà été démontrés pour expliquer l'impact des modifications post-traductionnelles des queues d'histone sur l'activité du complexe PRC2 (Poepfel et al., 2018).

Les domaines d'ULT1 suffisants pour médier une interaction physique avec les HMT CLF et SWN correspondent aux domaines SAND et CW-like, tandis que cette interaction ne requiert pas le domaine B-box-like, qui est connu pour être impliqué dans des interactions protéine-protéine et qui est suffisant pour médier l'oligomérisation de ULT1. Les domaines SAND et CW-like d'ULT1 pourraient jouer un rôle duel : liaison à l'ADN et interaction physique avec le PRC2 pour l'un, liaison avec des queues d'histone et avec le PRC2 pour l'autre.

Des expériences de biologie structurale permettraient d'obtenir des informations sur la position précise des zones de contact entre ULT1 et CLF/SWN au sein de la structure tridimensionnelle de ces protéines, et les effets de l'interaction sur la conformation des protéines.

Une des limites de l'approche de double hybride de Levure est que les interactions positives détectées peuvent ne pas forcément refléter une interaction physique directe entre les deux partenaires testés. En effet, une protéine produite par la levure elle-même pourrait médier l'interaction entre les deux partenaires, en particulier si les facteurs dont on teste l'interaction sont conservés au cours de l'évolution. Dans ce cas, des protéines de levure pourraient jouer le même rôle que leurs homologues chez les plantes dans la médiation d'une interaction entre les deux partenaires testés. On note cependant que les sous-unités du PRC2 ont été perdues chez la levure.

Conclusion

Le travail effectué sur les interactions entre ULT1 et les déméthylases d'H3K27me3 montrent que le mode d'action d'ULT1 pour la marque H3K27me3 est principalement indépendant de la déméthylase REF6 (et très probablement de ses homologues ELF6 et JMJ13). D'autre part, ULT1 et les méthyltransférases CLF/SWN interagissent *in vivo*, et leurs domaines N-terminaux (en amont du domaine B-box like pour ULT1, et en amont des domaines SET pour les méthyltransférases) sont suffisants pour médier cette interaction (**Figure 34**).

Ces résultats vont dans le sens d'un rôle d'ULT1 dans l'inhibition du dépôt de marques répressives H3K27me3 *de novo*, plutôt que dans le retrait actif des marques. Ces marques pourraient ainsi être passivement diluées au cours des cycles de réplication de l'ADN et de division cellulaire au sein des tissus en division active, au niveau des méristèmes. Les expériences de cartographie de l'interaction entre ULT1 et les HMTs CLF et SWN permettent de cerner les domaines impliqués et seront informatives une fois intégrées avec les résultats qui seront obtenus dans le cadre des travaux de doctorat de J-B. Izquierdo et V. Geshkovski.

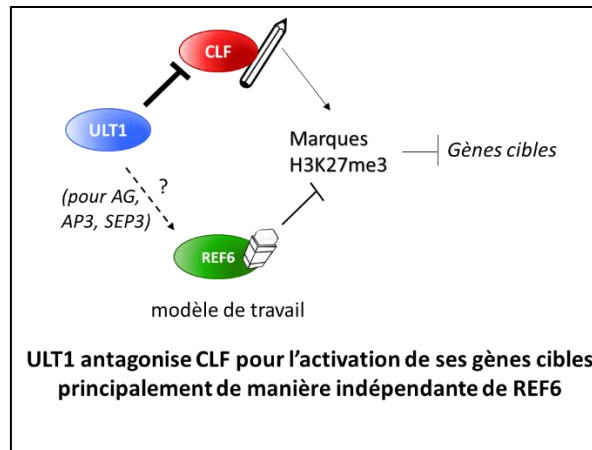


Figure 34 : Bilan et modèle de travail concernant les interactions entre ULT1 et les modifieurs de la chromatine pour la marque répressive H3K27me3.

III-B Interaction entre ULT1 et les remodeleurs de la chromatine

ULT1 et BRM, deux acteurs qui jouent un rôle anti-PRC2

L'étude des interactions entre ULT1 et les enzymes capables d'ajouter ou de retirer les marques H3K27me3 suggèrent que les fonctions activatrices d'ULT1 sur les gènes ciblés par la répression Polycomb semblent passer par une inhibition de l'activité du PRC2 plutôt que par un retrait actif des marques H3K27me3 par une déméthylase.

En parallèle d'un rôle anti-PRC2 via une interaction répressive avec ce dernier, ULT1 pourrait également agir de manière coopérative avec d'autres effecteurs chromatiniens pour permettre à des cibles de sortir de la répression médiée par le PRC2. Les remodeleurs de type SWI/SNF2 sont des candidats qui pourraient jouer un tel rôle qui expliquerait l'effet d'ULT1 sur la chromatine des gènes cibles.

En effet, les remodeleurs de type SWI2/SNF2 ont des fonctions anti-PRC2 connues. Chez la Drosophile, le gène Brahma a été initialement découvert par un crible génétique à la recherche de gènes capables de contrecarrer l'activité Polycomb pour l'activation des gènes Hox ; Brahma a été classé pour cette raison dans le groupe Trithorax (Tamkun et al., 1992). Chez la plante, le remodeleur BRM répond également à la définition génétique d'un facteur TrxG : la mutation *brm* supprime partiellement le phénotype de feuille recourbée *clf*, et des études de CHIP-seq à l'échelle du génome montrent que la perte-de-fonction *brm* provoque une augmentation des niveaux de marques H3K27me3 d'un facteur supérieur à 2 pour 258 gènes (Li et al., 2015).

Plusieurs hypothèses mécanistiques ont été proposées pour expliquer comment les remodeleurs de type SWI2/SNF2 pourraient activer l'expression génique. Premièrement, ils peuvent, en faisant glisser ou en évinçant des nucléosomes, augmenter l'étendue de la zone déplétée en nucléosomes située au niveau du TSS des gènes, et faciliter ainsi le recrutement de la machinerie transcriptionnelle. Ils peuvent de la même manière rendre accessible à des facteurs de transcription des séquences cis régulatrices présentes dans le promoteur proximal ou dans des enhancers distaux. Deuxièmement, puisque les remodeleurs peuvent contribuer à

l'éjection de nucléosomes, il a été proposé qu'ils permettent la perte de marques histone répressives par éjection des nucléosomes portant ces marques, qui pourraient être remplacés par des nucléosomes non marqués (Wu et al., 2012).

Enfin, il a été démontré chez les mammifères que les remodeleurs de type SWI2/SNF2 peuvent permettre l'éviction des complexes PcG de certains *loci*. Chez *A. thaliana*, c'est le cas pour le gène codant pour le répresseur floral *SVP* et pour le gène homéotique *BELL1*, pour qui les niveaux d'occupation par CLF et SWN sont plus élevés chez les mutants *brm* que chez les plantules sauvages (Li et al., 2015).

Malgré leur classification génétique dans la catégorie TrxG, les remodeleurs de la chromatine, tout comme ULT1, peuvent en fait avoir une action activatrice comme répressive en fonction des gènes considérés. Ainsi BRM est un répresseur direct de *KNAT2* et *KNAT6* (Zhao et al., 2015), et SYD est un répresseur direct de *WUS* (Kwon et al., 2005).

Chez *A. thaliana*, on connaît 4 protéines remodeleur appartenant à la famille SWI2/SNF2. Le travail qui suit s'intéresse à deux de ces remodeleurs : BRM, la seule protéine de cette famille à posséder un bromodomaine et des sites de liaison à l'ADN, et SPLAYED (SYD), son homologue le plus proche, qui présente des fonctions partiellement redondantes avec BRM (Bezhan et al., 2007), et ne traitera pas d'autres remodeleurs qui ont été identifiés chez *A. thaliana*.

Les résultats d'expériences de CHIP-seq réalisées dans l'équipe pour la marque H3K27me3 chez les mutants *ult1* et *brm* ont été comparés : parmi les 916 gènes cibles pour l'activation via la marque H3K27me3 (données de Julia Engelhorn non publiées, expériences réalisées sur des plantules de 7 jours sauvages, *ult1-3*, *ult2-2* et *35S::ULT1* dans l'écotype Ler), 708 sont également cibles de l'activation par BRM (expériences réalisées sur des plantules de 14 jours sauvages et *brm-1* dans l'écotype Col-0, (Li et al., 2015) (données retraitées par J. Engelhorn). Il existe un enrichissement significatif des cibles activées par ULT1 parmi les cibles activées par BRM et réciproquement (**Figure 35**). Parmi ces cibles communes, on retrouve le gène *AG* connu pour son rôle dans l'établissement des identités sépale et carpelle au sein de la fleur, et dans le déterminisme floral.

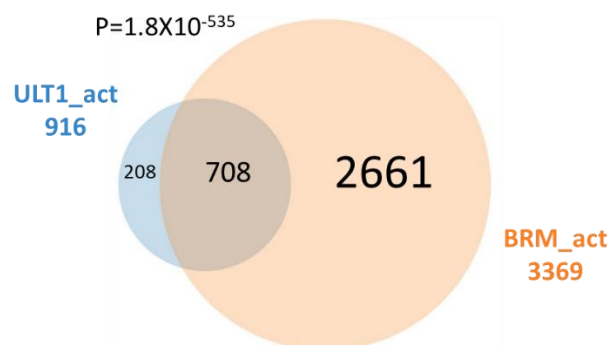


Figure 35 : Recouvrement entre gènes cibles pour l'activation pour la marque H3K27me3 pour ULT1 et BRM. Diagramme de Venn représentant les chevauchements entre les gènes activés par ULT1 pour la marque H3K27me3 (ULT1_act) (Engelhorn et al., non publié) et les gènes activés par BRM pour la marque H3K27me3 (Li et al., 2015). La p-value a été calculée avec un test hypergéométrique, en prenant pour taille d'échantillon $s=33602$, correspondant au nombre total de gènes annotés dans la base de données TAIR10.

Afin de tester l'hypothèse selon laquelle ULT1 et BRM agiraient de concert pour la régulation de gènes développementaux, j'ai analysé d'une part les interactions génétiques entre ULT1 et BRM au cours du développement de la plante, et d'autre part les interactions physiques entre ces deux partenaires. Ces résultats sont présentés dans l'article en préparation qui suit.

Dans cet article, deux mutants EMS de *brm* sont étudiés. L'allèle nul *brm-101* présente une mutation non-sens qui conduit à la production d'une protéine tronquée, dépourvue de site catalytique. L'allèle hypomorphe *brm-106* présente une mutation faux sens qui conduit à une substitution d'un résidu proline par un résidu leucine au niveau du site catalytique, entre les deux hélicases (**Figure 36**).

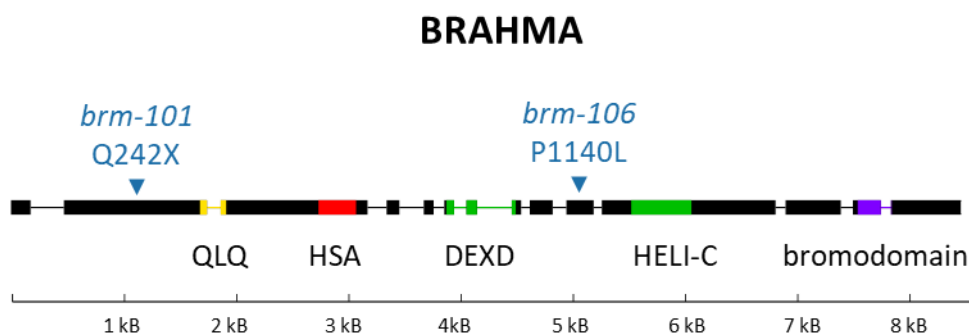


Figure 36 : Description des allèles de *brm* utilisés dans les travaux suivants.

Article : les facteurs TrxG ULTRAPETALA1/2 et BRAHMA jouent des rôles indépendants et synergiques pendant le développement d'*A. thaliana*.

The TrxG factors *ULTRAPETALA1/2* and *BRAHMA* play independent and synergistic roles in *Arabidopsis* development

Caroline Thouly¹, Marie Le Masson¹, Philipp Holzinger², Klaus Grasser², Cristel Carles¹ and Gilles Vachon^{1*}

¹ Université Grenoble Alpes, unité de formation et de recherche de Chimie et Biologie, Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRAE), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA), Institut de recherche interdisciplinaire de Grenoble (IRIG), Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, 38000 Grenoble, France; caroline.thouly@cea.fr (C.T.); marie.lemasson@cea.fr (M.L.M.); christel.carles@univ-grenoble-alpes.fr (C.C.C.)

² Department of Cell Biology & Plant Biochemistry, Biochemistry Centre, University of Regensburg, D-93040 Regensburg, Germany

* Correspondence: gilles.vachon@cea.fr; Tel.: +33-(0)438-780-569

Abstract

In plants, TrxG factors participate in different developmental processes from embryogenesis to floral development. TrxG is a heterogeneous group that plays a widespread role in chromatin regulation and how two TrxG factor pathways interact and participate to regulate developmental pathways is poorly understood. Here we investigated the relationship between the plant-specific *ULTRAPETALA1* and 2 (*ULT1/2*) and *BRAHMA* (*BRM*) pathways in the context of vegetative development and flower morphogenesis. Using triple mutants *ult1-3 ult2-2 brm-106*, we show that the nature of the relationship between *ULT1/2* and *BRM* is dependent on the developmental context. During vegetative development, *BRM* is epistatic over *ULT1/2* indicating that *ULT1/2* act through the *BRM* pathway. In flower development, *ULT1/2* and *BRM* show a synergistic relationship regarding carpel development and flower determinacy. We also show that *ULT1/2* and *BRM* can physically interact in yeast-two hybrid assays and that *ULT1/2*, *BRM* as well as known core subunits of SWI/SNF complexes belong to the same complexes in plant cells using immuno-precipitation. Altogether these results indicate that participation of the TrxG factors *ULT1/2* and *BRM* in chromatin dynamics occurs through both independent and synergistic pathways during plant development.

Introduction

Higher plants continuously and iteratively produce above-ground organs such as leaves, stems and flowers. Tissue-specific gene regulation during vegetative and reproductive stages is therefore a requirement and flexible regulation of gene expression through chromatin remodeling and epigenetic events is a key process to ensure correct development.

Different types of epigenetic modifications have been described, including DNA methylation, histone modifications and nucleosome remodeling, which play important roles in plant development and plasticity (Kaepler et al., 2000; Song et al., 2012).

Polycomb groups (PcG) and Trithorax groups (TrxG) correspond to protein complexes that regulate transcriptional repression and activation, respectively. The Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) acts through its histone lysine methyltransferase (HKMT) activity to catalyze the trimethylation of lysine 27 on histone 3 (H3K27me3), a hallmark of repressed chromatin state while the Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) acts through its H2AK ubiquitination activity on H2AK119.

In animals, TrxG factors were characterized genetically as suppressors of PcG mutant phenotypes as a result of their ability to counteract the activity of PcG proteins in homeotic gene regulation. TrxG is a heterogeneous group that plays a widespread role in transcriptional activation and encompasses several functional categories such as chromatin remodeling proteins, histone modifying (methyltransferases or demethylases), DNA-binding and accessory functions (Xiao et al., 2016). Plants utilize multiple TrxG factors to regulate gene transcription thereby modulating their development in response to multiple endogenous and environmental cues. How two TrxG factor pathways interact and how they participate to regulate developmental pathways is poorly understood.

The plant TrxG group includes a unique plant-specific protein named ULTRAPETALA1 (ULT1) and its paralogous protein ULT2, whose features differ from all TrxG components reported in animals and yeast. As all main TrxG factors, ULT1 can counteract PcG silencing (Carles and Fletcher 2009). Its physical interaction with the HKMT ATX1 (Carles and Fletcher, 2009; Pu et al., 2013) also reinforces its role as a TrxG factor, although ULT1 can also act independently of ATX1, in a tissue-specific fashion (Ornelas-Ayala et al., 2020). Moreover, the interactions of ULT1 with PcG proteins indicates non-TrxG roles for ULT1 as well (Xu et al., 2018).

In *Arabidopsis*, ULT1 has been described as a SAND (named after Sp100, AIRE, NucP41/75, DEAF-1) domain protein. The SAND domain has a DNA-binding function (Bottomley et al., 2001), and is conserved in plants and animals in combinations with many other protein domains such as SET-like and PHD domains (Nedelcu, 2019). ULT proteins also contain a B-box motif (Figure 2A) that could be involved in protein-protein or RNA interaction (Torok and Etkin, 2001; Carles et al., 2005; Khanna et al., 2009). In the case of OsULT1 from *Oryza sativa*, it has been shown that the B-box region is important for ULT1 multimerization (Roy et al., 2019).

In vitro assays have shown a broad specificity toward DNA sequences for the SAND domain, as the human DEAF-1 (Deformed Epidermal Autoregulatory Factor-1) homolog recognizes the

5'TTCG-3' sequence (Bottomley et al., 2001) while the SAND domain of recombinant OsULT1, has affinity for the 5'-GAGAG-3' sequence (Roy et al., 2019). ULT1 can also interact with the myb transcription factor UIF1 which acts as a repressor in flower development and has an AGAT/ATC logo DNA binding sequence (Moreau et al., 2016).

Previous studies have shown that ULT1 is a space and time determinant for *AG* induction in the center of the flower and a component of the later repression of *WUS* expression, thus leading to the termination of the floral meristem.

Similarly, the chromatin remodeler BRAHMA acts as a TrxG factor in its ability to suppress PcG mutant phenotypes and to activate homeotic gene expression in flowers. Thus, BRM is involved in the direct co-regulation of *AG* in flower development together with its paralogue SPLAYED (SYD) and LEAFY (LFY) (Wu et al., 2012).

BRM is a large protein of 2193 residues and has several canonical domains found in this family of proteins (Han et al., 2015). It contains an N-terminal region with a glutamine-rich region, a glutamine-leucine-glutamine (QLQ)-rich region and a helicase SANT-associated domain (HSA) as well as an adjacent domain termed A-HSA (Wu et al., 2012). Downstream of the HSA domain, BRM displays the central catalytic helicase-like ATPase domain composed of the DEXHc ATP-binding domain and the HELICc domain, both found in a diverse family of proteins helicases. The C-terminal region of BRM contains an AT-hook that allows BRM to bind DNA (Farrona et al., 2007) and a bromodomain which typically recognizes acetylated lysine residues, such as those on the N-terminal tails of histones (Zaware and Zhou, 2019).

BRM has been shown to be recruited to specific *loci* by direct physical interaction with the histone demethylase RELATIVE OF EARLY FLOWERING 6 (REF6), a plant-unique H3K27me3 demethylase that antagonizes Polycomb group activity at target *loci* (Lu et al., 2011) and displays several zinc-finger motifs that targets genomic *loci* containing a CTCTGYTY motif. Genome-wide analyses showed that REF6 colocalizes with BRM at many genomic sites with the CTCTGYTY motif and facilitates the recruitment of BRM. This indicates a mechanism for SWI2/SNF2 ATPase recruitment to these *loci* in which a specific DNA-binding protein precedes the remodeler at the target *loci*.

Besides its site-specific recruitment, BRM has been shown recently to have an overlapping role with the H2A variant H2A.Z with both antagonistic and cooperative contributions, especially on environmentally responsive genes (Torres and Deal, 2019).

In plants, however, BRM does not co-localize with the H3K27me3 mark (Li et al., 2015) but with acetylation marks on H3K9 and H3K14 (Sakamoto et al., 2018).

Here we investigated the relationship between ULT1/2 and BRM in the context of vegetative development and flower morphogenesis. Our phenotypic analyses show that BRM is epistatic over ULT1/2 during vegetative development while both act in a synergistic manner in the control of carpel number and floral determinacy. We also show that ULT1 can physically interact with a short N-terminal region of BRM in yeast two hybrid assays and co-immunoprecipitate with BRM and SWI/SNF core factors from plant cells. Altogether, our work shows

that two TrxG factors can have both epistatic and synergistic relationships during plant development and supports the view that ULT1/2 and BRM participate in the same complexes for the regulation of carpel development and floral determinacy.

Results

BRM is epistatic over ULT1 during vegetative development

To decipher the genetic relationship between *BRM* and *ULT1/2*, we first used a genetic approach and constructed the triple mutant *ult1-3 ult2-2 brm-106* thereafter mentioned as *ult1 ult2 brm-106*. Single mutants of *ult1* as well as double mutants *ult1 ult2* display developmental defects among which late flowering, increased floral organ number, ovule abortion and floral indeterminacy (Monfared et al., 2013) (Monfared and Fletcher, 2014). The hypomorphic *brm-106* allele (Efroni et al., 2013) (Levin et al., 1998) displays marked phenotypes such as slow growth, downward leaf curvature, early flowering but remains fully fertile contrary to strong alleles such as *brm-101* (Bezhanı et al., 2007).

We first looked at flowering time transition using *ult1 ult2 brm-106*. In our growing conditions, the *ult1 ult2* double mutant displayed a strong late flowering phenotype with an average of 22 leaves at bolting, compared to the wild-type *Ler* plants that bolted at 10 leaves on average (Figure 1A and B) while the single *brm-106* mutant showed the expected early flowering phenotype at 7 leaves. The triple mutant *ult1 ult2 brm-106* clearly displayed early flowering similar to the *brm-106* single mutant, indicating that *brm-106* was epistatic to the double mutant *ult1 ult2*.

BRM was reported to be involved in delaying the transition from juvenile to adult vegetative phases mainly through the action of the PRC2 H3K27me3 methylase SWN (Xu et al., 2016a). In Arabidopsis, this phase change is characterized by changes in the production of trichomes on the abaxial side of the leaf blade with juvenile leaves having no trichomes on their abaxial side while adult leaves do. In our conditions, approx. 8 juvenile leaves were produced in wild type plants until the transition occurred (Figure 1C). While, as expected, the *brm-106* mutant displayed shorter juvenile phases (Xu et al., 2016a), we report for the first time that the *ult1 ult2* double mutant showed a longer juvenile phase as the transition occurred at about 11 leaves on average. The triple *ult1 ult2 brm-106* displayed a transition phenotype similar to the *brm-106* mutant indicating again that *brm-106* was epistatic to *ult1 ult2*.

BRM and ULT1 show a synergistic action in controlling carpel development

Both *ULT1* and *BRM* have been reported to be involved in flower development and flower determinacy. We looked at floral organ numbers in each whorl of flowers from the different genotypes. As described in the literature, the double mutant *ult1 ult2* displayed increased organ numbers in all four whorls compared to wild type flowers (Figure 2) while *brm-106* flowers

had the same number of organs as wild type flowers in all four whorls (Levin et al., 1998). The triple mutant *ult1 ult2 brm-106* showed a number of organs in whorl 1 to 3 similar to the single mutant *brm-106*, but clearly displayed a number of carpels higher than the double mutant *ult1 ult2*. This indicates that *ULTs* and *BRM* genes have distinct relationships depending on floral whorls: an epistatic relationship in whorls 1 to 3 with *BRM* being required for *ULT1/2* function and a synergistic relationship in whorl 4 in the regulation of carpel number and presumably meristem size.

The gynoecia of *ult1 ult2 brm-106* flowers were often curved or aberrantly shaped, a phenotype that might indicate that indeterminacy was affected. Longitudinal sections of these gynoecia revealed additional structures that were absent from the wild-type, indicating that indeterminacy was affected in the triple *ult1 ult2 brm-106* mutant (Fig 3A). To investigate further the genetic relationship between *ULT1/2* and *BRM* in the process of floral determinacy, we constructed a triple mutant with the null allele *brm-101* and quantified the number of flowers displaying extra whorls within carpels of *ult1 ult2 brm-101* plants. In our conditions, the *ult1 ult2* double mutant showed some indeterminacy within carpels while the *brm-101* plants showed none (Table 1). In *ult1-3 ult2-2 brm-101* plants, the frequency of floral determinacy defects was more than three times higher (Table 1), and *brm-101* mutants also displayed floral indeterminacy (Fig 3B). In addition, the nature of the organs was very difficult to assess visually and resembled unstructured tissues. These results indicate that *ULT1/2* and *BRM* participate in a synergistic manner to arrest of the floral meristem.

***BRM* is not required for ectopic activation of homeotic genes by *ULT1* in leaves**

ULT1 and *BRM* have both been directly involved in the regulation of floral homeotic genes. *ULT1* counteracts the *PRC2* repression on *AG* and binds directly to the *AG* second intron (Carles and Fletcher, 2009). Similarly, *BRM* is required redundantly with *SYD* to directly activate the expression of *AG* or *AP3* in flowers (Wu et al., 2012).

As *ULT1/2* and *BRM* could act in an either dependent or independent manner depending on the floral whorl, we asked whether *ULT1* is dependent upon *BRM* in activating homeotic genes ectopically in vegetative tissues. To do so, we introgressed the *35S:ULT1* construct in the *brm-101* null allele background and measured the expression levels of the *AG* and *SEP3* homeotic genes in leaves of homozygous *brm-101* mutant lines (Figure 3A). Ectopic expression of *AG* and *SEP3* was detected in *35S:ULT1* plants and *35S:ULT1 brm-101* plants although to a slightly lower level. These experiments indicate that *BRM* is not required for *AG* and *SEP3* activation by *ULT1* in leaves.

***ULT1* interacts physically with *BRM* N-terminal regions**

Hypomorphic mutant phenotypes can be enhanced by loss-of-function mutations in genes that act in the same complexes (Pérez-Pérez et al., 2009). We tested the hypothesis that *ULT1* and *BRM* act in the same complex with yeast two hybrid assays. The large N-terminal region of

BRM encompassing the first 976 amino acids was first found to interact with the full-length of ULT1. We narrowed down the interacting domain to a 200 aa region that carries the A-HSA and HSA domains. This region also interacts with several transcription factors such as LFY or factors participating to BRM complexes (Thouly et al., 2020). These results show that ULT1 can physically interact with BRM and might participate to the same complexes.

To reinforce the hypothesis of ULT1 and BRM acting within the same complex, we looked at proteins interacting with ULT1 in plants cells. To identify proteins that form the complexes with ULT1, we expressed ULT1 fused to a N-terminal GS tag (2x protein G domains and streptavidin-binding peptide) in suspension cultured cells (ecotype Landsberg *erecta*) (Leene et al., 2015). Proteins co-immunoprecipitating with ULT1 were identified by mass spectrometry. Among the putative interactors we found BRM and SYD as well as known interacting factors of core SWI-SNF complexes such as BSH (Table 2) (Brzeski et al., 1999). Together, these results indicate that ULT1 can be a member of BRM complexes in plant cells.

Discussion

ULT1/2 and BRM pathways relative positions in Arabidopsis development

Both ULT1/2 and BRM have been reported to act as TrxG factors as they participate to the activation of homeotic genes by counteracting their repression by PcGs. However, beside homeotic gene regulation, both ULT1/2 and BRM can also act as repressors of gene expression. BRM-containing complexes can almost equally up- and down-regulate genes belonging to different regulatory pathways (Archacki et al., 2016)(Torres and Deal, 2019)(Yang et al., 2015). Similarly ULT1 can activate and repress genes in vegetative and reproductive development (Tyler et al., 2019).

Our work shows that during vegetative development, the juvenile-to-adult transition seems to be regulated in an opposite manner by ULT1/2 and BRM. The juvenile-to-adult transition is slowed down by BRM while ULT1/2 seem to be a positive regulator of the transition. It has been shown that miR156 is a master regulator of this transition and is a direct target of BRM which increases miR156 expression by directly binding to the *MIR156A* promoter (Xu et al., 2016b). Interestingly, *SWN* but not *CLF* partially counteracts this role of BRM by regulating the level of H3K27me3 at the *MIRNA156A locus*. While UTL1 is acting by counteracting *CLF* in vegetative development, it would be of particular interest to determine whether it also acts on miR156 level and *SWN* activity.

We also show that flowering time is regulated in an opposite manner by ULT1/2 and BRM in long days with ULT1/2 acting as a positive regulator and BRM acting as a negative regulator of flowering time. However, analysis of key regulatory flowering genes indicate that BRM acts as a repressor with a dual and antagonistic role in the regulation of flowering genes: BRM represses expression of the flowering promoting genes such as *CONSTANS (CO)*, *FLOWERING LOCUS T (FT)* and *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 (SOC1)* which belong to the photoperiod pathway and at the same time of the flowering repressor *FLOWERING LOCUS C (FLC)* (Farrona et al., 2011), the main target of the autonomous and vernalisation pathways. Also, BRM seems to impose a repressive chromatin configuration at the *FLC locus* as *brm* mutants show increasing levels of tri-methylated lysine 4 on histone H3 (H3K4me3) and a decreasing level of H3K27me3, two hallmarks of gene activation and repression respectively in eukaryotes.

Similarly, ULT1 also seems to be involved in the repression of *SOC1* and *FLC* genes at least in the *LFY* expression domain (Pu et al., 2013). Therefore it is possible that BRM and UTL1/2 both repress a common set of genes involved in flowering time regulation with BRM playing a broader role in repressing additional genes as well as additional pathways such as *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 9* (Richter et al., 2019).

Nevertheless, the epistatic relationship between BRM and ULT1/2 in juvenile-to-adult transition and in flowering time indicates that ULT1 could act through the BRM pathway to regulate these processes and possibly by repressing the BRM pathway.

A similar epistatic relationship was also observed in the development of floral organs in whorls 1 to 3 as the triple mutant *ult1 ult2 brm-106* showed the phenotype of the single *brm-106* mutant with a number of organs similar to wild-type in these whorls.

ULT1 and BRM physical interaction

A synergistic relationship was observed in whorl 4 organ development as carpel number increased markedly in the *ult1 ult2 brm-106* triple mutant. This synergistic action was likely revealed by the use of the hypomorphic allele *brm-106* in combination with the strong alleles *ult1-3 ult2-2*. This is also illustrated with the hypomorphic allele *brm-3* whose phenotype is enhanced by the loss-of-function in genes of BRAHMA-interacting proteins *BRIP1* and *BRIP2* (Yu et al., 2020) with *BRIP1* and *BRIP2* interacting physically with BRM.

The physical interaction between ULT1 and BRM observed in yeast two-hybrid and the co-immunoprecipitation of ULT1 with proteins belonging to BRM/SYD complexes from plant cells also support the idea that ULT1/2 and BRM might belong to the same complexes.

This interaction might be particularly relevant for the regulation of genes involved in the control of carpel number which often reflects the control floral meristem homeostasis.

In meristems, a feedback loop involving the transcription factor WUS is necessary to maintain robust stem cell activities. Previous studies have shown that ULT1 controls *AG* induction in the center of the flower which causes later *WUS* repression, thus leading to the termination of the floral meristem (Carles et al., 2004, 2005) (Moreau et al., 2016). Similarly, BRM is a direct co-regulator of *AG* in flower development together with SYD and LFY (Wu et al., 2012). Our observation that floral indeterminacy is under the control of both ULT1/2 and BRM might indicate that the *AG*-*WUS* loop is controlled by ULT1/2 and BRM. Therefore, it would be interesting to determine whether *AG* and *WUS* are mis-regulated in the triple mutant and whether ULT1/2 co-localize with BRM on *AG locus*.

Conclusion

In this work we have studied the genetic and physical interactions between ULT1/2 and BRM. We have shown that these TrxG factors display different genetic interactions depending on the developmental context of Arabidopsis development. Their physical interaction raises the possibility that ULT1 acts with the remodeling machinery.

Material and methods

Plant material and growth conditions

The *A. thaliana* Landsberg *erecta* (*Ler*) ecotype was used as the WT strains in all experiments. *A. thaliana* plants were cultivated under long-day conditions (16 h light/8 h dark) at 18°C/16°C degrees.

Yeast two-hybrid (Y2H) screen

For binary interaction tests, ULT1 full-length and BRM N-terminal half were expressed as Gal4 DNA-BD (BD: binding domain) or Gal4 AD (AD: activation domain) fusion proteins. ULT1 and BRM-transformed yeast strains were mated and the resulting diploids were selected for the presence of both plasmids with medium lacking Leu and Trp (–LT). The selected strains were then dotted on –LT or –LTAH medium (lacking Leu, Trp, His and Ade) on which only the diploids presenting protein interactions can grow.

Statistical assessment of floral organ identity and number

Counting of floral organs was carried out on the ten first flowers of first ten bolting plants for each genotype. We used a bilateral student test to assess whether the mean values are significantly different between genotypes.

Immunoprecipitation of tagged-ULT1 from plant cells

The full-length *ULT1* cDNA was cloned in frame within pCambia2300-5'GStag-polyA, a vector derived from pCambia2300 displaying the 35S::CaMV promoter followed by the coding sequence for the GS-tag, a multicloning site, and the CaMV poly(A) site, using the KpnI and EcoRI sites from the MCS, and plant cells were transformed. Affinity purification and mass-spectrometry were performed as described previously (Antosz et al., 2017). Three independent replicates were performed, and proteins were ranked by their Mascot score.

References

- Antosz, W., Pfab, A., Ehrnsberger, H.F., Holzinger, P., Köllen, K., Mortensen, S.A., Bruckmann, A., Schubert, T., Längst, G., Griesenbeck, J., et al. (2017). The Composition of the Arabidopsis RNA Polymerase II Transcript Elongation Complex Reveals the Interplay between Elongation and mRNA Processing Factors. *Plant Cell* 29, 854–870. .
- Archacki, R., Yatusевич, R., Buszewicz, D., Krzyczmonik, K., Patryn, J., Iwanicka-Nowicka, R., Biecek, P., Wilczynski, B., Koblowska, M., Jerzmanowski, A., et al. (2016). Arabidopsis SWI/SNF chromatin remodeling complex binds both promoters and terminators to regulate gene expression. *Nucleic Acids Res.* 45, 3116–3129. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1273>.
- Bezhani, S., Winter, C., Hershman, S., Wagner, J.D., Kennedy, J.F., Kwon, C.S., Pfluger, J., Su, Y., and Wagner, D. (2007). Unique, Shared, and Redundant Roles for the Arabidopsis SWI/SNF Chromatin Remodeling ATPases BRAHMA and SPLAYED. *Plant Cell* 19, 403–416. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.048272>.
- Brzeski, J., Podstolski, W., Olczak, K., and Jerzmanowski, A. (1999). Identification and analysis of the Arabidopsis thaliana BSH gene, a member of the SNF5 gene family. *Nucleic Acids Res.* 27, 2393–2399. .
- Carles, C.C., and Fletcher, J.C. (2009). The SAND domain protein ULTRAPETALA1 acts as a trithorax group factor to regulate cell fate in plants. *Genes Dev.* 23, 2723–2728. <https://doi.org/10.1101/gad.1812609>.
- Carles, C.C., Lertpiriyapong, K., Reville, K., and Fletcher, J.C. (2004). The ULTRAPETALA1 Gene Functions Early in Arabidopsis Development to Regulate Floral Meristem Determinacy. *Genetics* 1903, 1893–1903. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.028787>.
- Carles, C.C., Choffnes-Inada, D., Reville, K., Lertpiriyapong, K., and Fletcher, J.C. (2005). ULTRAPETALA1 encodes a SAND domain putative transcriptional regulator that controls shoot and floral meristem activity in Arabidopsis. *Development* 132, 897–911. <https://doi.org/10.1242/dev.01642>.
- Dekkers, B.J.W., Willems, L., Bassel, G.W., van Bolderen-Veldkamp, R.P. (Marieke), Ligterink, W., Hilhorst, H.W.M., and Bentsink, L. (2012). Identification of Reference Genes for RT-qPCR Expression Analysis in Arabidopsis and Tomato Seeds. *Plant Cell Physiol.* 53, 28–37. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr113>.
- Efroni, I., Han, S., Kim, H.J., Wu, M., Steiner, E., Birnbaum, K.D., Hong, J.C., Eshed, Y., and Wagner, D. (2013). Regulation of Leaf Maturation by Chromatin-Mediated Modulation of Cytokinin Responses. *Dev. Cell* 24, 438–445. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.01.019>.
- Farrona, S., Hurtado, L., and Reyes, J.C. (2007). A Nucleosome Interaction Module Is Required for Normal Function of Arabidopsis thaliana BRAHMA. *J. Mol. Biol.* 373, 240–250. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.07.012>.
- Farrona, S., Hurtado, L., March-Diaz, R., Schmitz, R.J., Florencio, F.J., Turck, F., Amasino, R.M., and Reyes, J.C. (2011). Brahma Is Required for Proper Expression of the Floral

Repressor FLC in Arabidopsis. PLoS ONE 6, e17997. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017997>.

Han, S.-K., Wu, M.-F., Cui, S., and Wagner, D. (2015). Roles and activities of chromatin remodeling ATPases in plants. *Plant J.* 83, 62–77. <https://doi.org/10.1111/tpj.12877>.

Khanna, R., Kronmiller, B., Maszle, D.R., Coupland, G., Holm, M., Mizuno, T., and Wu, S.-H. (2009). The Arabidopsis B-Box Zinc Finger Family. *Plant Cell* 21, 3416–3420. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.069088>.

Leene, J.V., Eeckhout, D., Cannoot, B., Winne, N.D., Persiau, G., Slijke, E.V.D., Vercruyse, L., Dedecker, M., Verkest, A., Vandepoele, K., et al. (2015). An improved toolbox to unravel the plant cellular machinery by tandem affinity purification of Arabidopsis protein complexes. *Nat. Protoc.* 10, 169–187. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.199>.

Levin, J.Z., Fletcher, J.C., Chen, X., and Meyerowitz, E.M. (1998). A Genetic Screen for Modifiers of UFO Meristem Activity Identifies Three Novel FUSED FLORAL ORGANS Genes Required for Early Flower Development in Arabidopsis. *Genetics* 149, 579–595. .

Li, C., Chen, C., Gao, L., Yang, S., Nguyen, V., Shi, X., Siminovitch, K., Kohalmi, S.E., Huang, S., Keqiang Wu, et al. (2015). The Arabidopsis SWI2 / SNF2 Chromatin Remodeler BRAHMA Regulates Polycomb Function during Vegetative Development and Directly Activates the Flowering Repressor SVP. *PLoS Genet.* 11, e1004944. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004944>.

Lu, F., Cui, X., Zhang, S., Jenuwein, T., and Cao, X. (2011). Arabidopsis REF6 is a histone H3 lysine 27 demethylase. *Nat. Genet.* 43, 715–719. <https://doi.org/10.1038/ng.854>.

Monfared, M.M., and Fletcher, J.C. (2014). The ULT trxB factors play a role in arabidopsis fertilization. *Plant Signal. Behav.* 9. <https://doi.org/10.4161/15592324.2014.977723>.

Monfared, M.M., Carles, C.C., Rossignol, P., Pires, H.R., and Fletcher, J.C. (2013). The ULT1 and ULT2 trxB genes play overlapping roles in arabidopsis development and gene regulation. *Mol. Plant* 6, 1564–1579. <https://doi.org/10.1093/mp/sst041>.

Moreau, F., The, E., Blanvillain, R., Lopez-vidriero, I., Franco-zorrilla, J.M., Dumas, R., Parcy, F., Morel, P., and Trehin, C. (2016). The Myb-domain protein ULTRAPETALA1 INTERACTING FACTOR 1 controls floral meristem activities in Arabidopsis. 6, 1108–1119. <https://doi.org/10.1242/dev.127365>.

Pérez-Pérez, J.M., Candela, H., and Micol, J.L. (2009). Understanding synergy in genetic interactions. *Trends Genet.* 25, 368–376. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2009.06.004>.

Pu, L., Liu, M.-S., Kim, S.Y., Chen, L.-F.O., Fletcher, J.C., and Sung, Z.R. (2013). EMBRYONIC FLOWER1 and ULTRAPETALA1 Act Antagonistically on Arabidopsis Development and Stress Response. *Plant Physiol.* 162, 812–830. <https://doi.org/10.1104/pp.112.213223>.

Richter, R., Kinoshita, A., Vincent, C., Martinez-gallegos, R., Gao, H., Driel, A.D. Van, Hyun, Y., Mateos, J.L., and Coupland, G. (2019). Floral regulators FLC and SOC1 directly regulate expression of the B3-type transcription factor TARGET OF FLC AND SVP 1 at the

Arabidopsis shoot apex via antagonistic chromatin modifications. *PLoS Genet.* 15, e1008065. <https://doi.org/10.5061/dryad.b0j2td6>.

Sakamoto, T., Tsujimoto-inui, Y., Sotta, N., Hirakawa, T., Matsunaga, T.M., Fukao, Y., Matsunaga, S., and Fujiwara, T. (2018). Proteasomal degradation of BRAHMA promotes Boron tolerance in Arabidopsis. *Nat. Commun.* 9, 5285. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07393-6>.

Thouly, C., Masson, M.L., Lai, X., Carles, C.C., and Vachon, G. (2020). Unwinding BRAHMA Functions in Plants. *Genes* 11, 90. .

Torres, E.S., and Deal, R.B. (2019). The histone variant H2A . Z and chromatin remodeler BRAHMA act coordinately and antagonistically to regulate transcription and nucleosome dynamics in Arabidopsis. *Plant J.* 99, 144–162. <https://doi.org/10.1111/tpj.14281>.

Tyler, L., Miller, M.J., and Fletcher, J.C. (2019). The Trithorax Group Factor ULTRAPETALA1 Regulates Developmental as Well as Biotic and Abiotic Stress Response Genes in Arabidopsis. *G3 GenesGenomesGenetics* 9, 4029 LP – 4043. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400559>.

Wu, M.-F., Sang, Y., Bezhani, S., Yamaguchi, N., Han, S.-K., Li, Z., Su, Y., Slewinski, T.L., and Wagner, D. (2012a). SWI2/SNF2 chromatin remodeling ATPases overcome polycomb repression and control floral organ identity with the LEAFY and SEPALLATA3 transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 3576–3581. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113409109>.

Wu, M.M.-F., Sang, Y.Y., Bezhani, S., Yamaguchi, N., Han, S.-K.S.-K., Li, Z., Su, Y., Slewinski, T.L., and Wagner, D. (2012b). SWI2/SNF2 chromatin remodeling ATPases overcome polycomb repression and control floral organ identity with the LEAFY and SEPALLATA3 transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 3576–3581. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113409109>.

Xu, Y., Guo, C., Zhou, B., Li, C., Wang, H., Zheng, B., Ding, H., Zhu, Z., Peragine, A., Cui, Y., et al. (2016). Regulation of Vegetative Phase Change by SWI2 / SNF2 Chromatin Remodeling ATPase BRAHMA. *Plant Physiol.* 172, 2416–2428. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01588>.

Yang, S., Li, C., Zhao, L., Gao, S., Lu, J., Zhao, M., Chen, C.-Y., Liu, X., Luo, M., Cui, Y., et al. (2015). The Arabidopsis SWI2/SNF2 Chromatin Remodeling ATPase BRAHMA Targets Directly to PINs and Is Required for Root Stem Cell Niche Maintenance. *Plant Cell* 27, 1670–1680. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00091>.

Yu, Y., Liang, Z., Song, X., Fu, W., Xu, J., Lei, Y., Yuan, L., Ruan, J., Chen, C., Fu, W., et al. (2020). BRAHMA-interacting proteins BRIP1 and BRIP2 are core subunits of Arabidopsis SWI/SNF complexes. *Nat. Plants* 6, 996–1007. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0734-z>.

Zaware, N., and Zhou, M.-M. (2019). Bromodomain biology and drug discovery. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 26, 870–879. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0309-8>.

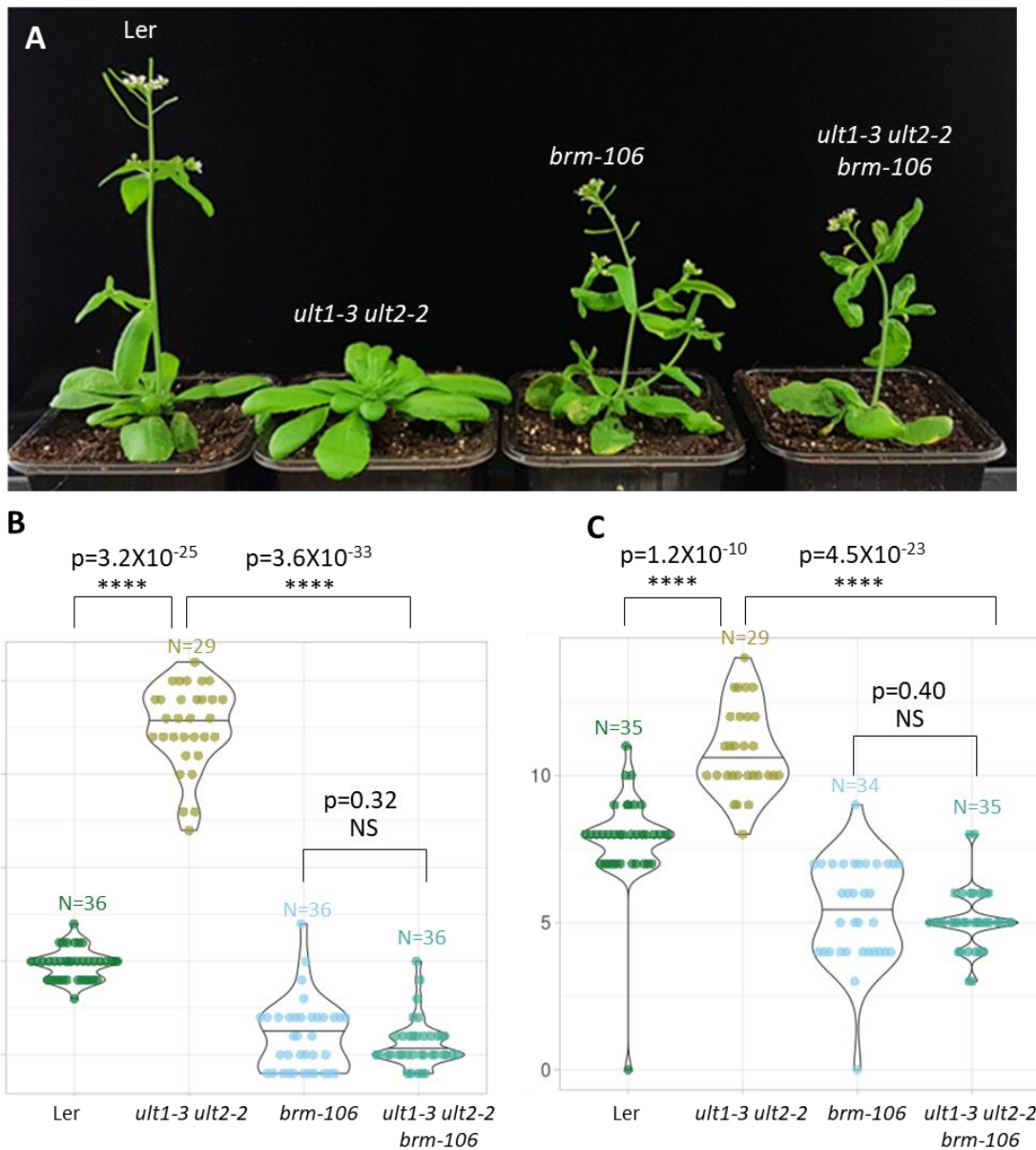


Fig. 1: *brm-106* and is epistatic over *ult1-3 ult2-2* regarding flowering time.

A: plants grown under long day conditions. B: Rosette leaf number at bolting. C: Rank of the first leaf displaying abaxial trichomes. A bilateral Student's test was used to assess significance of the differences between genotypes.

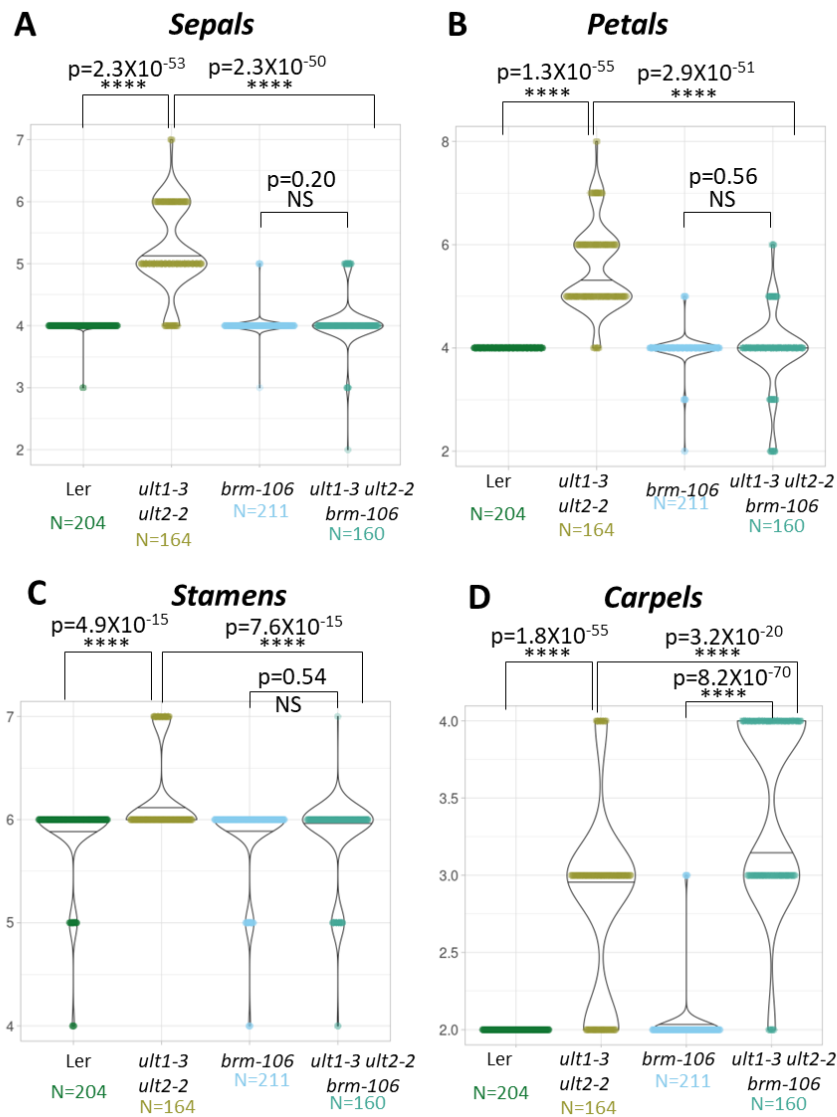


Fig. 2: *brm-106* is epistatic over *ult1-3 ult2-2* regarding the number of sepals, petals and stamens and both have a synergistic interaction for the number of carpels.

Number of sepals (A), petals (B), stamen (C) and carpels (D) per flowers. Countings were performed on the first 10 flowers of different plants. A bilateral Student test was used to assess significance of the differences between genotypes.

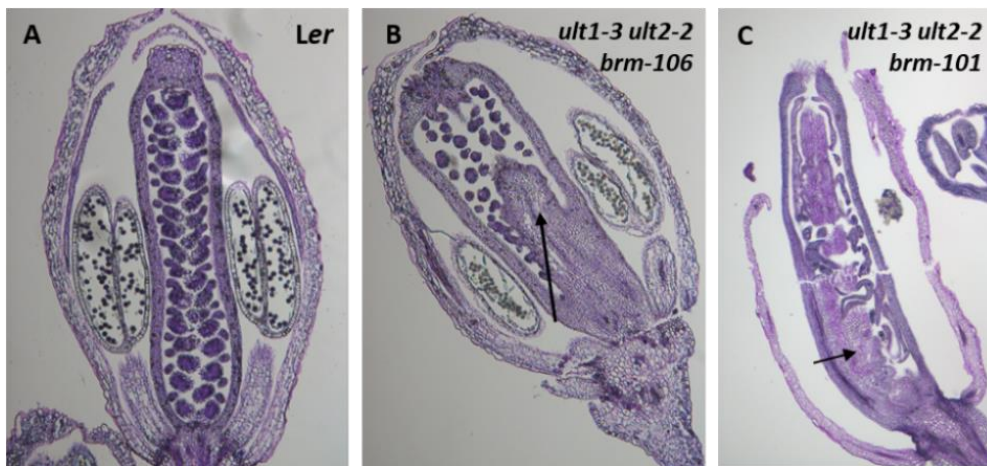


Fig. 3: Flower indeterminacy in carpels of wild type and triple mutants

Longitudinal sections of carpels stained with toluidine blue. A: Wild type; B: *ult1 ult2 brm-106*; C: *ult1 ult2 brm-101*. The arrows indicate ectopic tissues arising from the carpel margins.

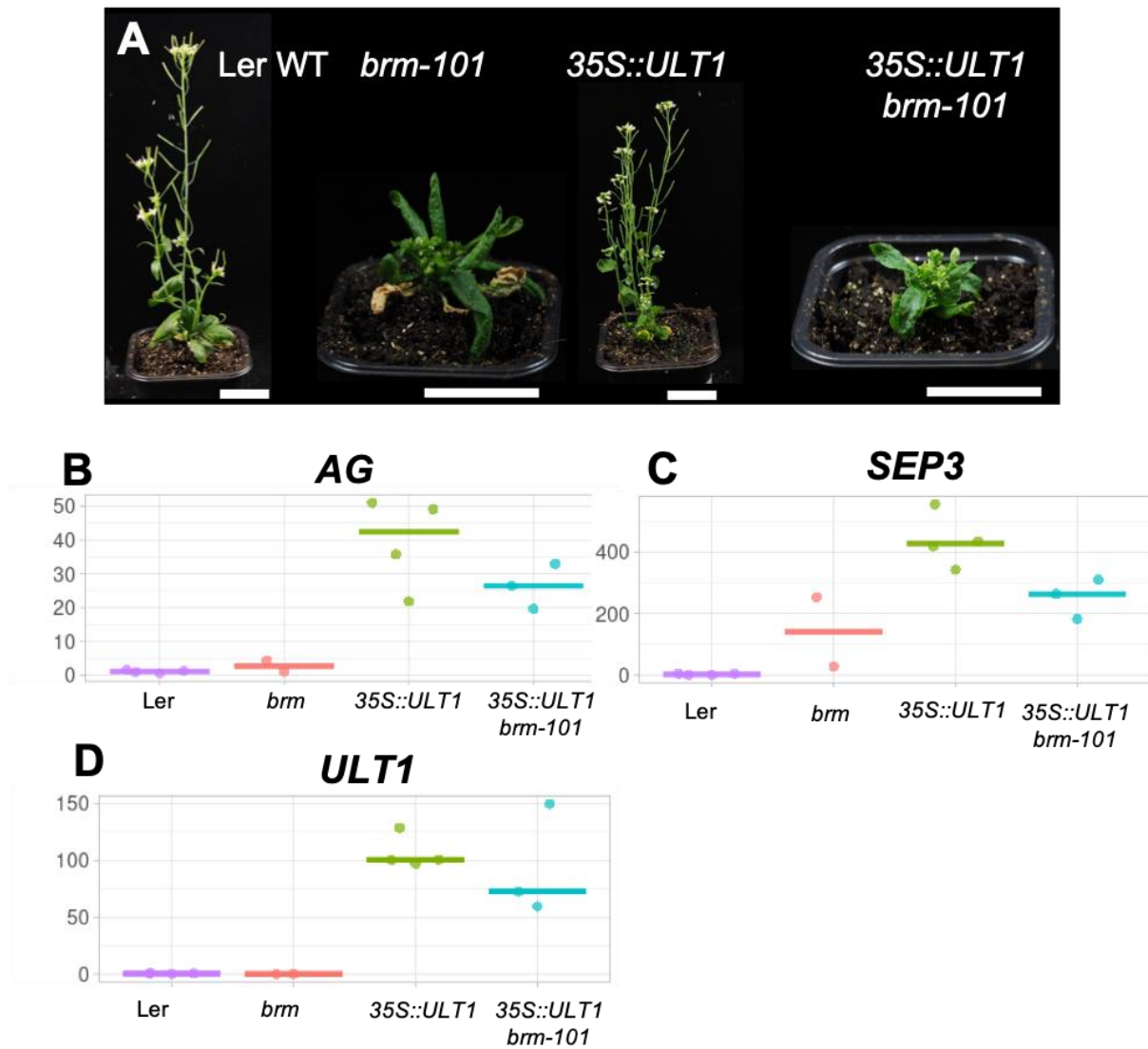


Fig. 4: *BRM* is dispensable for *ULT1* overexpressing phenotypes and de-repression of floral homeotic genes.

A: F3 plants from a cross between *brm-101/+* and *35S::ULT1*, 54 days after germination. B to C: RT-qPCRs performed on *AG*, *SEP3* and *ULT1* from 3 rosette leaves per individual and 2 to 4 individuals per genotype. Each dot represents the expression levels of the target gene for an individual. *MON1* was used as a reference gene (Dekkers et al., 2012).

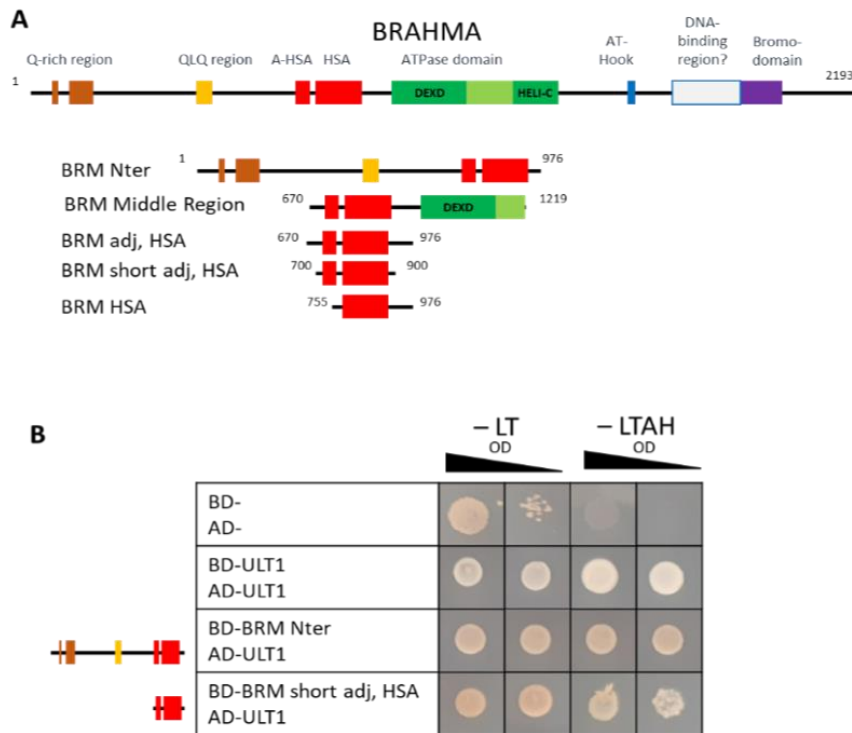


Fig 5: Physical interaction between ULT1 and BRM

A: Constructs used in Y2H experiments for the mapping of the interactions between ULT1 and BRM.

B: Results of two-hybrid assays performed on AH109 (AD) and Y187 (BD) strains. Pictures of droplets at an optical density of 10 and 1 were taken after 7 days of growth on either permissive (-LT) or selective medium (-LTAH). Only constructs that induce yeast growth on selective medium are shown. The dimerization of ULT1 was used as a positive control (Monfared et al, 2013).

Table 1: Frequency of flower indeterminacy in carpels

Genotype	Flowers with indeterminacy
Ler	0/80 (0%)
<i>ult1-3 ult2-2</i>	5/80 (6%)
<i>brm-101</i>	0/95 (0%)
<i>ult1-3 ult2-2 brm-101</i>	20/98 (20%)

Table 2: Members of the BRM/SYD complex that were immunoprecipitated with ULT1 in plant cells.

Proteins with an average Mascot score above 80 are shown. Three independent replicats were performed.

Protein	Mascot score
BSH	209
SYD	167
BRM	112
SWI3D	130
CHR12	84

ULT1 interagit physiquement avec SYD

Les domaines d'interaction physique entre SYD et ULT1 ont également été cartographiés par des expériences de double hybride de levure (**Figure 37**). Ces expériences montrent que la partie située en N-terminale du domaine catalytique de SYD, qui contient le domaine HSA, est suffisante pour médier une interaction physique avec ULT1. Contrairement à ce qui était observé pour BRM, les constructions SYD HSA ou SYD adj, HSA ne permettent pas l'obtention d'un signal positif en double hybride de levure. J'ai cloné les fragments homologues BRM-Nter et SYD-Nter, qui donnent tous deux un signal en double hybride de levure, ainsi que les fragments homologues BRM HSA et SYD HSA dans des vecteurs permettant de tester des interactions par la technique de BiFC. Ces constructions pourront ensuite être utilisées pour des transformations transitoires en épiderme d'oignon afin de confirmer les interactions ULT1-BRM et ULT1-SYD par une autre approche *in vivo*, et pour déterminer si le domaine d'interaction entre BRM et SYD peut être restreint au domaine HSA.

J'ai également mené des expériences en double hybride de levure entre d'une part les constructions BRM FL, BRM Nter, SYD 1500 et SYD Nter, et d'autre part les différentes versions tronquées de ULT1 présentées en **Figure 31**. Seule la version pleine longueur de ULT1 a permis de mettre en évidence une interaction avec BRM et SYD.

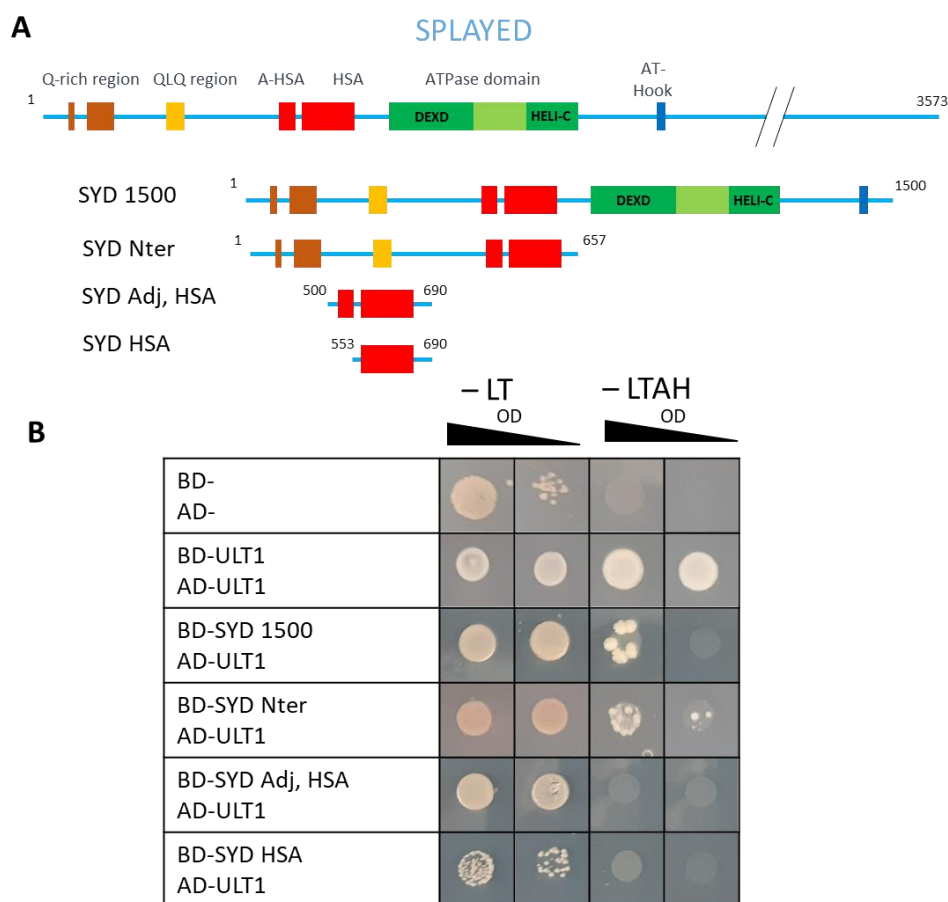


Figure 37 : ULT1 interagit physiquement avec la partie N-Terminale de SYD. A : Constructions utilisées pour la cartographie des domaines de SYD impliqués dans l'interactions physiques avec ULT1. B : Tests d'interaction en double hybride de Levure réalisés sur des souches AH109 (AD) et Y187 (BD). Les

photographies ont été prises après 7 jours de croissance des levures avec une densité optique à 600nm égale à 11 (à gauche) et à 1,1 (à droite). Les constructions BD-ULT1 12-252 et BD-ULT1 148-237 ne donnent pas de signal positif ni avec AD-BRM Nter ni avec AD-SYD Nter. L'interaction entre ULT1 et lui-même a été utilisée comme contrôle positif.

Identification de gènes cibles pour ULT1/2 et BRM lors du développement des carpelles

Une partie des fleurs *ult1-3 ult2-2 brm-101* présentent des structures ectopiques à l'intérieur des carpelles qui ne proviennent pas du centre de la fleur mais des marges du carpelle, à partir desquelles des ovules se développent normalement chez le sauvage (voir Figure 3C de l'article ci-dessus). Ce défaut pourrait ne pas être dû à un défaut de terminaison du méristème floral à proprement parler, mais à un défaut de différenciation du tissu méristématique des marges du carpelle (CMM), qui produirait des carpelles ectopiques à l'intérieur du pistil. ULT1/2 et BRM pourraient ainsi participer de façon coopérative à la régulation du CMM.

Il est également possible que les valves surnuméraires comptées chez les triples mutants *ult1-3 ult2-2 brm-101* ne proviennent pas de la fusion de carpelles surnuméraires, mais qu'elles se soient développées secondairement via une prolifération cellulaire excessive au sein du gynécée, qui donnerait naissance à plusieurs CMM au niveau des zones de fusion entre ébauches de carpelles. Ces CMM surnuméraires produiraient ensuite des cloisons et des valves surnuméraires. Un tel mécanisme a en effet été décrit pour des mutants faibles *clv*, qui ne présentent pas d'organes surnuméraires dans les trois premiers verticilles et dont les méristèmes floraux ne sont pas élargis (Durbak and Tax, 2011). De plus, il a été démontré que tandis que les voies *CLV1* et *CLV2/CRN* interagissaient différemment dans le méristème floral et dans le CMM : tandis que ces voies sont redondantes pour le contrôle de l'homéostasie du méristème floral, *CLV1*, *CLV2* et *CRN* sont tous les trois requis pour le contrôle du développement du gynécée (Durbak and Tax, 2011). D'une façon analogue, le fait que les défauts du gynécée des triples mutants *ult1 ult2 brm* puissent être causés par un défaut de régulation d'un méristème différent que le méristème floral pourrait ainsi expliquer pourquoi les mutations *ult1/2* et *brm* interagissent selon des modalités différentes dans le gynécée et les trois premiers verticilles de la fleur.

J'ai ainsi recherché *in silico* et dans la littérature des gènes candidats pour lesquels des défauts d'expression pourraient causer les phénotypes synergiques de ULT1/2 et BRM à l'intérieur du carpelle.

Les processus d'établissement du patron de la fleur, de déterminisme floral et de régulation du CMM sont interconnectés, et plusieurs facteurs de transcription sont impliqués dans plusieurs de ces processus. Pour trouver des gènes candidats, j'ai comparé les résultats de CHIP-seq pour la marque H3K27me3 réalisés dans différents fond génétiques pour ULT1 (Engelhorn et al., non publié), pour CLF (Shu et al., 2019) et pour BRM (Li et al., 2015). J'ai cherché des gènes qui étaient à la fois des cibles communes pour l'activation par ULT1 et BRM, et qui étaient connus comme impliqués dans le déterminisme floral et/ou la régulation du CMM. J'ai retenu 6 gènes qui répondent à ces critères (**Tableau 3**).

	Classification (données CHIP-seq H3K27me3)	Fonction biologique
<i>AG</i>	ULT1act, BRMact, CLFrep	Patron floral, déterminisme floral
<i>KNU</i>	ULT1act, BRMact, CLFact	Déterminisme floral
<i>CRC</i>	ULT1act, BRMact, CLFrep	Déterminisme floral, régulation du CMM
<i>SHP1/2</i>	ULT1act, BRMact, CLFrep	Régulation du CMM, différenciation des ovules
<i>STM</i>	ULT1act, BRMact, CLFact	Inhibition de la différenciation des cellules méristématiques des méristèmes aériens et du CMM

Tableau 3 : Sélection de gènes candidats qui pourraient être impliqués dans les phénotypes des carpelles des triples mutants *ult1 ult2 brm*. Ces gènes ont été identifiés comme étant à la fois des cibles pour l'activation par ULT1 et par BRM pour la marque H3K27me3 par des expériences de CHIP-seq, et ont des fonctions connues dans le déterminisme floral et/ou la régulation du CMM. Un défaut de régulation de ces gènes dans les triples mutants *ult1 ult2 brm* pourrait causer la production d'organes ectopique dans les carpelles, qui émergent soit du centre de la fleur, soit des marges du carpelle.

Des constructions pour hybridation *in situ* ont été obtenues pour *WUS* et pour chacun de ces gènes, et seront utilisés afin de pouvoir comparer leurs patrons d'expression dans les carpelles sauvages, *ult1 ult2, brm* et *ult1 ult2 brm*.

Conclusion

Mes travaux ont permis de démontrer qu'ULT1 et ULT2 pouvaient interagir soit de façon antagoniste, soit de façon coopérative au cours du développement de la plante, en fonction des phénomènes développementaux considérés. L'interaction physique détectée entre ULT1 et le domaine N-terminal de BRM, mais aussi de SYD, pourrait être le support de la coopération entre ces deux types de facteur au centre de la fleur, pour le déterminisme floral et/ou le développement du gynécée. La dé-répression des gènes homéotiques floraux *AG* et *SEP3* par ULT1 ne requiert pas la fonction de BRM et peut donc se produire par des mécanismes indépendants de celui-ci (**Figure 38**).

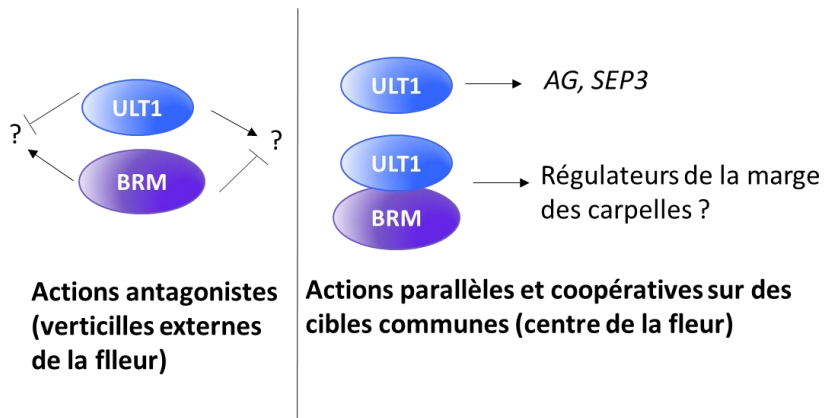


Figure 38 : Bilan et modèle de travail concernant les interactions entre ULT1 et BRM

DISCUSSION GENERALE

IV Discussion générale

IV-A Lien entre ULT1 et le dépôt de la marque H3K27me3 par le PRC2

IV-A-1 ULT1 induit une dé-répression de ses gènes cibles (dont les MADS de la fleur) indépendamment de la déméthylase JMJ spécifique d'H3K27me3, REF6

Le premier objectif de ma thèse était de tester si l'effet de ULT1 sur les marques H3K27me3 opérait par une déméthylation active de ses cibles, via une interaction avec une histone déméthylase (HDMT). J'ai pu démontrer, par des approches de génétique moléculaire, que REF6 n'est pas requis dans les tissus végétatifs pour qu'ULT1 puisse dé-réprimer les gènes homéotiques floraux *AG*, *AP3* et *SEP3*. Inversement, j'ai également montré qu'ULT1 n'est pas requis pour la dé-répression par REF6 de ces mêmes gènes homéotiques dans les tissus végétatifs. Ces résultats sont cohérents avec le fait que parmi les cibles d'ULT1 pour l'activation via la marque H3K27me3, les cibles pour la répression par CLF sont sur-représentées (p-value : $9,1 \times 10^{-180}$, données de J.Engelhorn & C. Carles), mais pas les cibles pour l'activation par les HDMT (qui sont au contraire significativement appauvries, p-value : $2,7 \times 10^{-9}$, données de J.Engelhorn & C. Carles). Le fait que le recoupement entre cibles pour CLF et pour ULT1 soit plus important que le recoupement entre cibles pour REF6 et pour CLF indique que tandis qu'ULT1 jouerait un rôle global dans la dé-répression des cibles du PRC2 dans différents contextes développementaux, REF6 et les deux autres déméthylases d'H3K27me3 ne seraient impliquées dans l'activation de gènes développementaux que pour un nombre restreint de *loci*.

Plusieurs remarques sont cependant à noter concernant ces conclusions. Premièrement, la dé-répression des gènes homéotiques floraux par ULT1 dans le contexte perte-de-fonction *ref6* pourrait mettre en jeu l'action d'ELF6 et/ou JMJ13 dont les fonctions sont partiellement redondantes avec celle de REF6. Les niveaux d'expression des gènes homéotiques floraux n'ont pas pu être testés chez *35S::ULT1 elf6 ref6 jmj13*, car la faible fertilité de ces mutants ne permettait pas d'obtenir des plantules de ce génotype en quantité suffisante pour en extraire les ARN puis mener des expériences de RT-qPCR. Pour obtenir de telles plantules en quantité suffisante, il aurait été possible, en F2 du croisement *35S::ULT1 X elf6 ref6 jmj13*, de choisir des plantes *35S::ULT1 elf6 ref6/+ jmj13* ou *35S::ULT1 elf6/+ ref6 jmj13G*, qui ont une meilleure fertilité que le triple mutant, puis de génotyper leur descendance et de réaliser les extractions d'ARN, non pas sur un pool de plantules entières, mais sur les feuilles des plantes au génotype vérifié *35S::ULT1 elf6 ref6 jmj13*.

Deuxièmement, j'ai comparé les niveaux d'expression de gènes cibles dans les génotypes sauvage, *ref6*, *35S::ULT1* et *35S::ULT1 ref6*, mais pas les niveaux de marques H3K27me3 pour ces cibles. Or, il est possible que l'activation de l'expression d'un gène soit observée sans que le niveau de la marque H3K27me3 ne baisse par rapport aux niveaux chez le sauvage. Il a en effet été montré par des études à l'échelle du génome, portant sur l'induction de la floraison, que les changements des niveaux d'expression des gènes qui s'opèrent au cours de ce

processus corrèlent en premier lieu avec des changements sur les marques H3K4me3 mais pas H3K27me3, et que la perte des marques H3K27me3 se produit plusieurs jours après l'activation transcriptionnelle (Engelhorn et al., 2017; You et al., 2017). Il a également été montré, dans le cadre de la réponse au stress, que l'activation transcriptionnelle des gènes *COR15A* et *ATGOLS3* causée par une exposition au froid précède la disparition des marques H3K27me3, et que lors du retour à une température chaude ces deux gènes sont inactivés sans que les marques H3K27me3 ne réapparaissent (Kwon et al., 2009). Cependant, les expériences de ChIP-seq et de RNA-seq déjà réalisées sur des plantules *ult1-3*, *ult2-2* et *35S::ULT1* (Engelhorn et.al, non publié) montrent qu'il existe 2925 gènes pour lesquels la marque H3K27me3 est réduite chez les plantules *35S::ULT1*, contre seulement 73 gènes surexprimés par rapport au sauvage. Il est donc très vraisemblable que chez *35S::ULT1*, la diminution du niveau de la marque H3K27me3 soit responsable de la surexpression mesurée par RNA-seq chez certains gènes cibles, plutôt qu'une conséquence indirecte de l'activation transcriptionnelle par ULT1. Cependant il faut également noter que les techniques de ChIP-seq et de RNA-seq ont des sensibilités différentes qui peuvent être à l'origine de ces écarts. Des expériences de ChIP-PCR pourraient être réalisées pour les trois gènes homéotiques étudiés, sur les quatre génotypes sauvage, *ref6*, *35S::ULT1* et *35S::ULT1 ref6*. Si la perte des marques H3K27me3 est observée chez *35S::ULT1 ref6*, cela permettrait de conclure que l'activité d'ULT1 conduit à la perte des marques H3K27me3 indépendamment de REF6. Alternativement, si l'activation des gènes chez *35S::ULT1 ref6* n'est pas accompagnée d'une perte des marques H3K27me3, cela démontrerait que l'activation par ULT1 est possible malgré un maintien des marques H3K27me3.

IV-A-2 ULT1 pourrait contrer le dépôt de la marque H3K27me3 via une interaction physique avec le complexe PRC2

Puisqu'ULT1 ne requiert pas la déméthylation par REF6 pour la dé-répression de ses gènes cibles, l'hypothèse alternative pour expliquer l'effet de son activité sur la chromatine des cibles est qu'il inhiberait le dépôt de *novo* de la marque par CLF/PRC2. L'activité anti-PRC2 d'ULT1 pourrait impliquer une interaction physique entre ULT1 et CLF et/ou SWN. Les résultats obtenus en double hybride de levure m'ont permis de confirmer l'existence d'une interaction physique *in vivo* entre ULT1 et CLF, mais aussi entre ULT1 et son homologue SWN, ce qui est compatible avec l'hypothèse selon laquelle ULT1 inhiberait le complexe PRC2. Le domaine C5 de CLF/SWN et les domaines SAND et CW-like d'ULT1 sont suffisants pour médier cette interaction. Ces résultats représentent une première étape et pourraient permettre de mieux comprendre le rôle d'ULT1 sur l'activité du PRC2. Ce rôle pourrait être duel, puisque les expériences de ChIP-seq réalisées sur la marque H3K27me3 sur des lignées perte-de-fonction et gain-de-fonction pour ULT1 ont permis de définir 916 cibles pour l'activation mais également 1363 cibles pour la répression. L'interaction physique ULT1-CLF pourrait donc avoir un effet inhibiteur mais également activateur sur l'activité du PRC2.

Ainsi, les hypothèses que j'avais formulées concernant les effets d'ULT1 sur l'activité du PRC2 peuvent être classées en deux catégories : ULT1 aurait un impact sur le recrutement du complexe PRC2 à ces cibles, et/ou il aurait un effet sur son activité catalytique, indépendamment de son recrutement.

Pour tester l'hypothèse selon laquelle ULT1 impacterait le recrutement du PRC2 à ses cibles, il serait possible de mesurer les niveaux d'occupation de CLF et/ou SWN chez des plantes perte-de-fonction *ult1* et *35S::ULT1*. Les différences d'occupation de CLF et de SWN qui seraient éventuellement détectées par rapport à un fond génétique sauvage, pourraient ensuite être mises en lien avec ce que l'on sait des mécanismes de recrutement du complexe PRC2 ; comme la présence d'ARN longs non codants ou de certains motifs PRE connus. Un lien causal entre l'interaction physique ULT1-PRC2 et un éventuel effet d'ULT1 sur le recrutement du complexe resterait ensuite à tester, par exemple par l'utilisation de variants d'ULT1 ou CLF portant des mutations sur les résidus impliqués dans leur interaction physique.

Alternativement, l'interaction physique entre ULT1 et CLF ou SWN pourrait inhiber l'activité catalytique du complexe PRC2 indépendamment de son recrutement. Les sous-hypothèses que j'avais formulées étaient les suivantes : ULT1 pourrait empêcher l'assemblage des sous-unités du complexe, et/ou il pourrait empêcher la stimulation allostérique du PRC2 (par un peptide H3K27me3 localisé sur un nucléosome adjacent ou par les résidus H3K4me0 et H3K36me0 de l'histone qui sert de substrat).

Une fonction anti-PRC2 qui passe par une interaction physique avec ce dernier, en impactant la composition du complexe a été décrite pour les transposases domestiquées ANTAGONIST OF LHP1-1 (ALP1) et ALP2. Comme pour *ult1*, les mutations *alp1* et ou *alp2* suppriment les phénotypes *clf* en contrecarrant la dé-répression ectopique de gènes tels que *AG*, *SEP3* et *FT* qui se produit chez les mutants *prc2*. Le sauvetage des mutants *prc2* par *alp1/alp2* est associé à une restauration partielle des marques H3K27me3 pour certaines des cibles. Suite à des expériences d'IP-MS montrant qu'ALP1 et ALP2 s'associent à un complexe PRC2 contenant EMF2, FIE, MEA, CLF ou SWN, mais ne révélant pas d'interaction avec les protéines accessoires LHP1 et EMF1, il a été proposé qu'ALP1 et 2 contrecarrent la répression par le PRC2 en empêchant son association avec ces protéines accessoires (Velanis et al., 2020). Puisque les expériences d'IP-MS réalisées sur ULT1-GS dans des cultures de cellules d'*Arabidopsis* (collab. Klaus Grasser, données non encore publiées), montrent qu'ULT1 pourrait être associé à FIE, SWN et MSI1, mais ne détectent pas d'interaction avec EMF2, VRN2, EMF1 et LHP1, l'activité anti-PRC2 d'ULT1 pourrait s'expliquer de façon analogue : ULT1 pourrait moduler l'action des complexes avec lesquels il s'associe en empêchant leur association avec d'autres éléments.

Quels que soient les mécanismes par lesquels l'interaction ULT1-CLF ou ULT1-SWN inhiberait l'activité méthyl-transférase du PRC2, la perte de la marque H3K27me3 dépendrait de leur dilution au cours des cycles de réplication de l'ADN et de divisions cellulaires. La transmission des marques H3K27me3 au cours des divisions cellulaires met en jeu des mécanismes qui ont lieu à la fois pendant et après le passage de la fourche de réplication (Hugues et al., 2020), et ULT1 pourrait contrecarrer l'action du PRC2 lors de l'une et/ou l'autre de ces étapes.

Des interactions physiques et/ou génétiques entre des membres des complexes PRC2 et de la machinerie de réplication ont ainsi pu être démontrées : c'est le cas (i) pour le complexe CAF-1 responsable de l'incorporation de dimères H3-H4 néosynthétisés, qui présente une sous-unité en commun avec le complexe PRC2 : MSI1 (Jiang and Berger, 2017), (ii) pour la polymérase de l'ADN epsilon EARLY IN SHORT DAYS 7 (ESD7) (del Olmo et al., 2016), (iii) pour la polymérase de l'ADN alpha INCURVATA 2 (ICU2), (iv) pour l'homologue de CFT4 ENHANCER

OF LHP1 (EOL1), (Zhou et al., 2017b), impliqué dans la ré-incorporation des dimères H3-H4 parentaux sur le brin retardé au cours de la réplication. Or, les expériences d'IP-MS réalisées sur ULT1 ont permis de détecter une interaction physique potentielle de ce dernier avec MSI1, ESD7, ICU2 et EOL1. ULT1 pourrait donc jouer un rôle dans la transmission des histones via ces interactions avec des composants de la machinerie de réplication.

Afin de tester si l'activation des cibles d'ULT1 dépend des divisions cellulaires, j'ai transformé des doubles mutants *ult1-3 ult2-2* avec une construction inductible *35S::ULT1-GR*. Les lignées obtenues pourraient en effet être utilisées pour étudier des aspects temporels de la dé-répression des gènes par ULT1. Ainsi, des plantes dans lesquelles l'activité d'ULT1 serait induite par un traitement au DEX, pourraient être prélevées à différents points temporels afin de déterminer quel est le temps nécessaire pour qu'ULT1 active ses cibles et pour que les marques H3K27me3 soient perdues aux *loci* correspondants. Des substances chimiques permettant d'inhiber (olomoucine) ou d'accélérer (acide gibbérellique) la division des cellules pourraient être utilisés afin de tester si ces traitements ont une influence sur la durée nécessaire pour l'activation transcriptionnelle de cibles par ULT1 et/ou pour la perte des marques H3K27me3. Une telle approche a déjà été déployée par (Sun et al., 2014) pour démontrer que la dé-répression de *KNU* par AG était dépendante du cycle cellulaire. Ces expériences n'ont pas pu être conduites pendant ma thèse car les lignées transgéniques obtenues n'exprimaient pas le transgène à un niveau suffisamment fort pour permettre une dé-répression de gènes cibles détectable par RT-qPCR après traitement des plantules au DEX.

IV-B ULT1 interagit physiquement et génétiquement avec BRM

IV-B-1 L'Interaction physique entre ULT1 et BRM s'accompagne d'une interaction génétique synergique pour le développement du gynécée

Le fort recouplement entre les cibles activées par ULT1 et BRM pour la marque H3K27me3 (p -value : $p=1.8 \times 10^{-535}$, données de J. Engelhorn & C. Carles), nous a amenés à nous interroger sur une coopération possible entre ces deux facteurs pour contrecarrer l'activité du PRC2 au cours du développement de la plante. J'ai pu détecter une interaction physique entre ces partenaires par des expériences en double hybride de Levure et une interaction génétique synergique entre *ult1 ult2* et *brm* dans le verticille le plus interne de la fleur : les triples mutants produisent des pistils sur lesquels on peut compter davantage de valves que chez les mutants *ult1 ult2* et *brm*, et produisent des excroissances à l'intérieur des carpelles plus fréquemment qu'*ult1 ult2*. Ces résultats vont dans le sens d'un fonctionnement coopératif d'ULT1/2 et de BRM, soit dans la régulation du méristème floral, soit dans celle du méristème de la marge du carpelle. Des interactions avec d'autres facteurs qui correspondent à la définition génétique du groupe Trithorax ont déjà été décrites à la fois pour ULT1 et BRM : ULT1 interagit physiquement avec la méthyltransférase sur H3K4 ATX1 (Carles and Fletcher, 2009), et BRM peut être recruté à des cibles de concert avec la déméthylase H3K27me3 REF6 via la reconnaissance de séquences cis par les domaines ZnfC2H2 portés par cette dernière (Li et al., 2016). De telles interactions physiques entre différents facteurs TrxG permettraient le couplage de leurs activités pour l'activation de cibles.

Les défauts observés chez les triples mutants *ult1 ult2 brm* n'ont pour l'instant pas été reliés à des défauts de régulation de gènes spécifiques. Des expériences d'hybridation *in situ* sur des coupes de fleurs triples mutants sont en cours pour observer les patrons d'expression de gènes candidats, sélectionnés pour leurs rôles connus dans le déterminisme floral comme *AG* et *WUS* et/ou la régulation du CMM comme *SHP1*. Si l'on parvient à identifier de tels gènes, alors des expériences pourront être mises en place pour répondre à des questions mécanistiques concernant les rôles d'ULT1/2 et de BRM dans leur régulation. Par exemple, des expériences de CHIP-qPCR avec des anticorps dirigés contre la marque H3K27me3 sur ces cibles permettrait de savoir si les dérégulations transcriptionnelles observées chez le triple mutant sont associées à une perte ou un gain de cette marque, ou si elles sont indépendantes de cette dernière.

Pour tester le rôle qu'ULT1 pourrait avoir dans le recrutement de BRM, des plantes *ult1 ult2* pourraient être croisées avec une lignée transgénique exprimant la protéine BRM fusionnée à une étiquette. Les niveaux d'occupation de BRM au niveau du TSS de ses cibles pourraient ensuite être mesurés grâce à des expériences de CHIP-seq et/ou de CHIP-qPCR sur des cibles spécifiques, afin de déterminer si la perte de l'activité ULT1/2 a un effet sur ces niveaux d'occupation.

L'activité catalytique des remodeleurs peut avoir des conséquences directes sur l'accessibilité de gènes cibles à la chromatine (qui peut être mesurée par des expériences d'ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin with highthroughput sequencing)), et sur le niveau d'occupation nucléosomale et le positionnement des nucléosomes (qui peuvent être mesurés par des expériences de Mnase-seq (micrococcal nuclease digestion with deep sequencing)). La mise en place de telles approches permettrait ainsi de mesurer l'accessibilité de la chromatine et/ou l'occupation nucléosomale au niveau du TSS ou de séquences régulatrices connues pour des gènes qui sont à la fois régulés par ULT1 et par BRM, chez des mutants *ult1 ult2*, *brm* et *ult1 ult2 brm*, et de relier les effets de ces mutations à l'activité catalytique de BRM.

IV-B-2 Les interactions génétiques entre BRM et ULT1 sont antagonistes ou synergiques, selon les phénomènes développementaux étudiés

Tandis que *brm* interagit de façon synergique avec *ult1 ult2* au centre de la fleur pour le développement des carpelles, *brm* est épistatique sur *ult1 ult2* pour le temps de floraison et pour la durée de la phase juvénile des feuilles de rosette, ainsi que pour le nombre d'organes dans les trois premiers verticilles des fleurs : les phénotypes de floraison tardive, de maturation retardée des feuilles et la production de sépales, de pétales et d'étamines surnuméraires des mutants *ult1 ult2* sont supprimés par l'ajout d'une mutation *brm-106*. ULT1/2 et BRM jouent donc des rôles antagonistes pour ces processus développementaux. Le fait que BRM et ULT1/2 interagissent selon des modalités différentes en fonction du contexte développemental étudié est à mettre en parallèle avec des observations similaires faites lors des études d'interactions génétiques entre facteurs chromatiniens TrxG ou PcG, dont la nature peut varier en fonction des processus développementaux et/ou des gènes étudiés. C'est par exemple le cas (i) de BRM qui restreint l'occupation et l'activité de SWN/CLF pour de nombreux *loci*, parmi lesquels le répresseur de la floraison *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)*,

mais qui promeut l'occupation et l'activité de CLF/SWN sur d'autres *loci*, parmi lesquels *WRKY123* (Li et al., 2015) ; (ii) du remodeleur PKL qui présente une activité antagoniste avec le PRC2 pour la régulation du méristème racinaire (Aichinger et al., 2011) mais agit en coopération avec le PRC2 pour la répression des miR156 lors de la transition vers la phase végétative adulte (Hu et al.) ; et de (iii) ULT1 et ATX1 qui interagissent de façon antagoniste avec EMF1 pour la régulation du temps de floraison, mais qui agissent avec EMF1 pour réprimer les gènes de la graine après germination (Xu et al., 2018a).

Puisque les facteurs chromatinien semblent interagir entre eux selon des modalités différentes en fonction des contextes considérés, comparer leurs effets dans des tissus spécifiques pourrait fournir des informations supplémentaires concernant leur mode d'action. BRM lui-même se comporte différemment suivant le contexte développemental : pour le gène cible floral *SEP3*, par exemple, il agit comme activateur dans la fleur (Wu et al., 2012) et comme répresseur dans les plantules (Bezhani et al., 2007). Il serait possible de répéter les RT-qPCRs dans la lignée *35S::ULT1 brm-106* dans des inflorescences plutôt que des feuilles afin de tester si BRM est également dispensable pour l'activation par ULT1 dans ces autres tissus où les gènes homéotiques floraux doivent être activés dans des conditions normales.

Des différences dans les modalités de régulation des gènes, et donc possiblement de fonctionnement des facteurs chromatinien, peuvent être observées entre différents territoires du méristème floral. Ces différences ont par exemple été mises en évidence par des expériences réalisées avec des constructions rapportrices GUS fusionnées à diverses formes tronquées de l'intron régulateur d'AG. L'activation d'AG est donc régulée par des mécanismes distincts, qui mettent en jeu des éléments *cis* différents, en fonction des verticilles considérés (Deyholos and Sieburth, 2000).

ULT1/2 et BRM interagissent génétiquement selon des modalités différentes pour le contrôle du nombre d'organes dans les trois premiers verticilles et pour le développement du gynécée au centre de la fleur. Chez les mutants *ult1*, l'activation d'AG n'est retardée que dans une zone restreinte située au centre du méristème floral (Carles and Fletcher, 2009). La comparaison entre les effets des perte-de-fonction *ult1 ult2*, *brm* et *ult1 ult2 brm*, au sein de différents territoires du méristème floral pourrait permettre de mettre en évidence des effets territoire-spécifiques de ces acteurs, en particulier pour la régulation d'AG. Différentes techniques expérimentales peuvent être mises en œuvre pour isoler et analyser spécifiquement les cellules situées au centre des méristèmes floraux. Par exemple, l'expression de protéines fusionnées à la GFP sous le contrôle de promoteurs spécifiques de certaines zones méristématiques a permis d'isoler ces cellules par FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) et d'établir le paysage transcriptomique des cellules souches qui expriment *CLV3* d'une part, et d'autre part, des cellules du centre organisateur qui expriment *WUS* (Yadav et al., 2009). Une autre technique, l'INTACT (isolation of nuclei tagged in specific cell types) (Deal and Henikoff, 2011), est basée sur l'expression, sous un promoteur spécifique des tissus que l'on cherche à étudier, d'une protéine chimère ancrée dans l'enveloppe nucléaire, qui peut être biotinylée, permettant ainsi la purification par affinité (biotine-streptavidine) de noyaux spécifiques du tissu d'intérêt. Cette technique a permis d'étudier la dynamique des marques H3K27me3 et H3K4me3 au cours de l'induction de la floraison par les jours longs dans les

cellules méristématiques uniquement, en excluant les cellules des ébauches d'organes (You et al., 2017). De telles approches pourraient être mises en place pour connaître les effets d'ULT1 sur l'expression et/ou les effets des marques H3K27me3 dans des tissus spécifiques.

IV-B-3 ULT1 pourrait interagir de façon redondante avec BRM et SYD

J'ai pu montrer au cours de mes travaux de thèse qu'ULT1 interagissait physiquement à la fois avec BRM et avec son homologue SYD, et qu'ULT1 pouvait activer les gènes homéotiques floraux indépendamment de BRM. Ce dernier résultat pourrait s'expliquer par une redondance fonctionnelle entre BRM et SYD dans la régulation de ces gènes dans les tissus végétatifs. La double mutation *brm syd* étant embryo-létale, il n'est pas possible d'introduire le transgène *35S::ULT1* dans une telle lignée pour évaluer si ULT1 requiert la fonction BRM/SYD dans son ensemble pour activer ses cibles. Cependant, SYD possède une activité de répresseur sur *SEP3* dans les tissus végétatifs (Bezhan et al., 2007). L'activation de *SEP3* par ULT1 dans les tissus du mutant *brm* indique par conséquent qu'ULT1 peut contrecarrer cette répression par SYD.

Alternativement, les interactions ULT1-BRM et ULT1-SYD pourraient avoir des fonctions différentes. BRM et SYD présentent des domaines homologues dans leur partie située en N-terminal de leur domaine catalytique, qui est suffisante pour médier l'interaction avec ULT1. Leurs extrémités C-terminales sont en revanche différentes. BRM possède en C-terminal du domaine catalytique des domaines capables de se lier à l'ADN et/ou aux nucléosomes, parmi lesquels un crochet AT et un bromodomaine. Les mutants qui expriment une version de BRM délétée pour cette dernière région peptidique présentent un phénotype *brm* modéré: les domaines C-terminaux de BRM jouent donc un rôle dans la fonctionnalité de la protéine sans être strictement indispensables pour l'activité de BRM (Farrona et al., 2007). SYD ne présente pas de bromodomaine en C-terminal du crochet AT; sa partie C-terminale est composée d'un long domaine non structuré qui n'est pas requis pour la fonction de la protéine, puisqu'un transgène codant pour une version de SYD délétée de ce domaine C-terminal complémente les mutants nuls *syd* (Su et al., 2006). Puisque SYD est dépourvu de bromodomaine, il pourrait interagir avec les nucléosomes via une interaction avec une autre protéine qui porterait cette fonction. ULT1, qui possède un domaine SAND présentant une affinité pour l'ADN, pourrait remplir cette fonction. J'ai effectué des croisements entre des plantes *syd-1/+*, *syd-2/+* et *ult1-3 ult2-2*. La descendance pourra être génotypée afin d'analyser les interactions génétiques entre *syd* et *ult1 ult2*.

IV-C ULT1 pourrait jouer un rôle dans la régulation chromatinienne des gènes environnementaux.

Les travaux présentés dans cette thèse se sont intéressés au rôle d'ULT1 dans le cadre des reprogrammations génétiques qui ont lieu au cours du développement d'*Arabidopsis*. Or, les gènes développementaux ne sont pas les seuls gènes dont l'expression n'est activée que dans certains contextes spécifiques et dont la régulation est contrôlée à un niveau chromatinien : c'est également le cas de gènes impliqués dans la réponse à des stress environnementaux.

Chez le Riz, un rôle a été identifié pour ULT1 dans la régulation du gène *OsDREB1b* de réponse au stress salin. Deux heures après le transfert de plantules dans un milieu concentré en sel, on observe une augmentation des niveaux d'occupation d'ULT1 sur le promoteur d'*OsDREB1b* associé à une réduction de la marque H3K27me3 (Roy et al., 2019).

Les expériences d'IP-MS réalisées sur ULT1, et dont les résultats ne sont pas encore publiés, ont permis de détecter la protéine FORGETTER 1 (FGT1) comme un interacteur physique potentiel. Ces résultats nous ont amenés à nous intéresser au rôle qu'ULT1 pourrait avoir dans le cadre de la mémoire de la réponse au stress thermique. En effet, FGT1, un homologue de la protéine de Drosophile *stawberry notch*, joue un rôle dans le maintien au cours du temps de l'expression de gènes de mémoire tels qu'*HSA32*. Le maintien de l'expression de ces gènes de mémoire au cours du temps permet aux plantes qui ont déjà été exposées à un stress thermique de mieux résister à l'application d'un deuxième choc thermique. De plus, comme ULT1, FGT1 interagit physiquement et génétiquement avec BRM, et a un effet sur l'occupation nucléosomale au niveau du TSS de ses cibles (Brzezinka et al., 2016). Le facteur FGT1 a donc été découvert dans le contexte de la mémoire au stress, mais il pourrait également jouer des rôles dans des processus développementaux.

L'étude de la réponse au stress peut permettre de mettre en place des systèmes expérimentaux avantageux dans lesquels on peut observer les effets d'un stress au cours du temps sur l'expression des gènes de réponse (par qPCR) et les marques chromatinienne associées (par CHIP-qPCR) en prenant pour référence les niveaux d'expression et de marques pour ces gènes avant induction.

C'est pourquoi je me suis intéressée au rôle qu'ULT1 pourrait avoir dans la réponse au stress thermique, en coopération avec FGT1 et BRM. Pour cela, j'ai réalisé des tests de la mémoire thermique sur des plantules *ult1-3*, *ult1-3 ult2-2* et *35S::ULT1* afin de déterminer si la mémoire thermique était altérée chez ces mutants. Pour cela, les plantules sont soumises à un premier choc thermique appelé « priming », remises en conditions de culture normales, puis soumises à un deuxième choc thermique deux ou trois jours après. La proportion de plantules qui ont survécu au deuxième choc thermique est ensuite quantifiée. Cependant, je ne suis pas parvenue à calibrer ces expériences de manière à retrouver les résultats obtenus par (Brzezinka et al., 2016) pour les génotypes *fgt1-1* et sauvages. J'ai également réalisé des croisements entre *fgt1-1* et *ult1-3*, *ult1-3 ult2-2* et *35S::ULT1* afin d'étudier les interactions génétiques entre *FGT1* et *ULT1/2*, mais le génotypage de la descendance n'a pu être terminé faute de temps. Des constructions ont également été obtenues au laboratoire pour permettre de tester en double hybride de Levure les interactions physiques entre ULT1 et FGT1.

IV-D Conclusion générale

Par ces travaux de thèse, j'ai pu analyser les interactions entre le régulateur développemental ULT1 et deux familles de facteurs chromatinien : les modificateurs (écrivain PRC2 et effaceurs JMJ) et les remodeleurs ATPase SWI/SNF (BRM, SYD) dans la régulation de processus développementaux qui impliquent l'activation et la répression de gènes dans des contextes appropriés. J'ai pu montrer que les mécanismes par lesquels ULT1 active les gènes homéotiques floraux *AG*, *SEP3* et *AP3*, qui sont ciblés par le PRC2, ne requièrent pas un retrait

actif de la marque H3K27me3 par l'effaceur REF6. La régulation des cibles d'ULT1 peut par contre faire intervenir des interactions avec deux facteurs chromatinien de nature différentes. D'une part, ULT1 interagit avec le complexe PRC2, et pourrait ainsi jouer un rôle dans l'activation de cibles du PRC2 par une dilution de la marque qu'il dépose au cours des divisions cellulaires. D'autre part, ULT1 interagit physiquement et génétiquement avec le remodeleur BRM, en particulier pour le développement du dernier verticille des fleurs, au sein duquel ces deux facteurs pourraient agir d'une manière coopérative pour la régulation de cibles communes.

REFERENCES

V Références

- Ahmad, K., and Henikoff, S. (2002). The Histone Variant H3.3 Marks Active Chromatin by Replication-Independent Nucleosome Assembly. *Mol. Cell* 9, 1191–1200. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00542-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00542-7).
- Aichinger, E., Villar, C.B.R., Di Mambro, R., Sabatini, S., and Köhler, C. (2011). The CHD3 chromatin remodeler PICKLE and polycomb group proteins antagonistically regulate meristem activity in the Arabidopsis root. *Plant Cell* 23, 1047–1060. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.083352>.
- Alonso-Cantabrana, H., Ripoll, J.J., Ochando, I., Vera, A., Ferrándiz, C., and Martínez-Laborda, A. (2007). Common regulatory networks in leaf and fruit patterning revealed by mutations in the Arabidopsis ASYMMETRIC LEAVES1 gene. *Dev. Camb. Engl.* 134, 2663–2671. <https://doi.org/10.1242/dev.02864>.
- Alvarez-Venegas, R., Pien, S., Sadler, M., Witmer, X., Grossniklaus, U., and Avramova, Z. (2003). ATX-1, an Arabidopsis Homolog of Trithorax, Activates Flower Homeotic Genes. *Curr. Biol.* 13, 627–637. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00243-4](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00243-4).
- Andrés, F., and Coupland, G. (2012). The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nat. Rev. Genet.* 13, 627–639. <https://doi.org/10.1038/nrg3291>.
- Angel, A., Song, J., Dean, C., and Howard, M. (2011). A Polycomb-based switch underlying quantitative epigenetic memory. *Nature* 476, 105–108. <https://doi.org/10.1038/nature10241>.
- Antosz, W., Pfab, A., Ehrnsberger, H.F., Holzinger, P., Köllen, K., Mortensen, S.A., Bruckmann, A., Schubert, T., Längst, G., Griesenbeck, J., et al. (2017). The Composition of the Arabidopsis RNA Polymerase II Transcript Elongation Complex Reveals the Interplay between Elongation and mRNA Processing Factors. *Plant Cell* 29, 854–870. .
- Archacki, R., Yatusevich, R., Buszewicz, D., Krzyczmonik, K., Patryn, J., Iwanicka-Nowicka, R., Biecek, P., Wilczynski, B., Koblowska, M., Jerzmanowski, A., et al. (2016). Arabidopsis SWI/SNF chromatin remodeling complex binds both promoters and terminators to regulate gene expression. *Nucleic Acids Res.* 45, 3116–3129. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1273>.
- Ariel, F., Jegu, T., Latrasse, D., Romero-Barrios, N., Christ, A., Benhamed, M., and Crespi, M. (2014). Noncoding Transcription by Alternative RNA Polymerases Dynamically Regulates an Auxin-Driven Chromatin Loop. *Mol. Cell* 55, 383–396. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.06.011>.
- Baile, F., Gómez-Zambrano, Á., and Calonje, M. (2021a). Roles of Polycomb complexes in regulating gene expression and chromatin structure in plants. *Plant Commun.* 100267. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2021.100267>.

Baile, F., Merini, W., Hidalgo, I., and Calonje, M. (2021b). EAR domain-containing transcription factors trigger PRC2-mediated chromatin marking in Arabidopsis. *Plant Cell* *33*, 2701–2715. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab139>.

Beh, L.Y., Colwell, L.J., and Francis, N.J. (2012). A core subunit of Polycomb repressive complex 1 is broadly conserved in function but not primary sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, E1063–1071. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118678109>.

Bezhan, S., Winter, C., Hershman, S., Wagner, J.D., Kennedy, J.F., Kwon, C.S., Pfluger, J., Su, Y., and Wagner, D. (2007). Unique, Shared, and Redundant Roles for the Arabidopsis SWI/SNF Chromatin Remodeling ATPases BRAHMA and SPLAYED. *Plant Cell* *19*, 403–416. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.048272>.

Bieluszewski, T., Xiao, J., Yang, Y., and Wagner, D. (2021). PRC2 activity, recruitment, and silencing: a comparative perspective. *Trends Plant Sci.* *26*, 1186–1198. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.06.006>.

Bloomer, R.H., Hutchison, C.E., Bäurle, I., Walker, J., Fang, X., Perera, P., Velanis, C.N., Gümüş, S., Spanos, C., Rappsilber, J., et al. (2020). The Arabidopsis epigenetic regulator ICU11 as an accessory protein of Polycomb Repressive Complex 2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *117*, 16660–16666. <https://doi.org/10.1073/pnas.1920621117>.

Borden, K.L. (1998). RING fingers and B-boxes: zinc-binding protein-protein interaction domains. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* *76*, 351–358. .

Bottomley, M.J., Collard, M.W., Huggenvik, J.I., Liu, Z., Gibson, T.J., and Sattler, M. (2001). The SAND domain structure defines a novel DNA-binding fold in transcriptional regulation. *Nat. Struct. Biol.* *8*, 626–633. <https://doi.org/10.1038/89675>.

Bowman, J.L., Sakai, H., Jack, T., Weigel, D., Mayer, U., and Meyerowitz, E.M. (1992). SUPERMAN, a regulator of floral homeotic genes in Arabidopsis. *Development* *114*, 599–615. <https://doi.org/10.1242/dev.114.3.599>.

Bowman, J.L., Baum, S.F., Eshed, Y., Putterill, J., and Alvarez, J. (1999). 4 Molecular Genetics of Gynoecium Development in Arabidopsis. In *Current Topics in Developmental Biology*, R.A. Pedersen, and G.P. Schatten, eds. (Academic Press), pp. 155–205.

Boyer, L.A., Latek, R.R., and Peterson, C.L. (2004). The SANT domain: a unique histone-tail-binding module? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 158–163. <https://doi.org/10.1038/nrm1314>.

Bratkowski, M., Yang, X., and Liu, X. (2017). Polycomb repressive complex 2 in an autoinhibited state. *J. Biol. Chem.* *292*, 13323–13332. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.787572>.

Bratzel, F., López-Torrejón, G., Koch, M., Pozo, J.C.D., and Calonje, M. (2010). Keeping Cell Identity in Arabidopsis Requires PRC1 RING-Finger Homologs that Catalyze H2A Monoubiquitination. *Curr. Biol.* *20*, 1853–1859. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.09.046>.

Brzeski, J., Podstolski, W., Olczak, K., and Jerzmanowski, A. (1999). Identification and analysis of the *Arabidopsis thaliana* BSH gene, a member of the SNF5 gene family. *Nucleic Acids Res.* 27, 2393–2399. .

Brzezinka, K., Altmann, S., Czesnick, H., Nicolas, P., Gorka, M., Benke, E., Kabelitz, T., Jähne, F., Graf, A., Kappel, C., et al. (2016). *Arabidopsis* FORGETTER1 mediates stress-induced chromatin memory through nucleosome remodeling. *ELife* 5, e17061. <https://doi.org/10.7554/eLife.17061>.

Byrne, M.E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J.M., Dunham, M., Hudson, A., and Martienssen, R.A. (2000). *Asymmetric leaves1* mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature* 408, 967–971. <https://doi.org/10.1038/35050091>.

Byrne, M.E., Simorowski, J., and Martienssen, R.A. (2002). *ASYMMETRIC LEAVES1* reveals knox gene redundancy in *Arabidopsis*. *Development* 129, 1957–1965. <https://doi.org/10.1242/dev.129.8.1957>.

Calonje, M., Sanchez, R., Chen, L., and Sung, Z.R. (2008). *EMBRYONIC FLOWER1* Participates in Polycomb Group–Mediated AG Gene Silencing in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20, 277–291. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.049957>.

Carles, C.C., and Fletcher, J.C. (2003). Shoot apical meristem maintenance: the art of a dynamic balance. *Trends Plant Sci.* 8, 394–401. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00164-X](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00164-X).

Carles, C.C., and Fletcher, J.C. (2009). The SAND domain protein *ULTRAPETALA1* acts as a trithorax group factor to regulate cell fate in plants. *Genes Dev.* 23, 2723–2728. <https://doi.org/10.1101/gad.1812609>.

Carles, C.C., Lertpiriyapong, K., Reville, K., and Fletcher, J.C. (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. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.028787>.

Carles, C.C., Choffnes-Inada, D., Reville, K., Lertpiriyapong, K., and Fletcher, J.C. (2005). *ULTRAPETALA1* encodes a SAND domain putative transcriptional regulator that controls shoot and floral meristem activity in *Arabidopsis*. *Development* 132, 897–911. <https://doi.org/10.1242/dev.01642>.

Cenik, B.K., and Shilatifard, A. (2021). *COMPASS* and *SWI/SNF* complexes in development and disease. *Nat. Rev. Genet.* 22, 38–58. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0278-0>.

Chanvivattana, Y., Bishopp, A., Schubert, D., Stock, C., Moon, Y.-H., Sung, Z.R., and Goodrich, J. (2004). Interaction of Polycomb-group proteins controlling flowering in *Arabidopsis*. *Development* 131, 5263–5276. <https://doi.org/10.1242/dev.01400>.

Chen, X. (2004). A MicroRNA as a Translational Repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis* Flower Development. *Science* 303, 2022–2025. <https://doi.org/10.1126/science.1088060>.

- Chickarmane, V.S., Gordon, S.P., Tarr, P.T., Heisler, M.G., and Meyerowitz, E.M. (2012). Cytokinin signaling as a positional cue for patterning the apical-basal axis of the growing Arabidopsis shoot meristem. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 4002–4007. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200636109>.
- Chung, Y., Zhu, Y., Wu, M.-F., Simonini, S., Kuhn, A., Armenta-Medina, A., Jin, R., Østergaard, L., Gillmor, C.S., and Wagner, D. (2019). Auxin Response Factors promote organogenesis by chromatin-mediated repression of the pluripotency gene SHOOTMERISTEMLESS. *Nat. Commun.* *10*, 886. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08861-3>.
- Clapier, C.R., and Cairns, B.R. (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu. Rev. Biochem.* *78*, 273–304. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.062706.153223>.
- Clapier, C.R., Iwasa, J., Cairns, B.R., and Peterson, C.L. (2017). Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin-remodelling complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *18*, 407–422. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.26>.
- Clark, S.E., Williams, R.W., and Meyerowitz, E.M. (1997). The CLAVATA1 Gene Encodes a Putative Receptor Kinase That Controls Shoot and Floral Meristem Size in Arabidopsis. *Cell* *89*, 575–585. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80239-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80239-1).
- Coen, E.S., and Meyerowitz, E.M. (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* *353*, 31–37. <https://doi.org/10.1038/353031a0>.
- Costa, S., and Dean, C. (2019). Storing memories: the distinct phases of Polycomb-mediated silencing of Arabidopsis FLC. *Biochem. Soc. Trans.* *47*, 1187–1196. <https://doi.org/10.1042/BST20190255>.
- Crevillén, P. (2020). Histone Demethylases as Counterbalance to H3K27me3 Silencing in Plants. *IScience* *23*, 101715. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101715>.
- Crevillén, P., Yang, H., Cui, X., Greeff, C., Trick, M., Qiu, Q., Cao, X., and Dean, C. (2014). Epigenetic reprogramming that prevents transgenerational inheritance of the vernalized state. *Nature* *515*, 587. <https://doi.org/10.1038/nature13722>.
- Cucinotta, M., Colombo, L., and Roig-Villanova, I. (2014). Ovule development, a new model for lateral organ formation. *Front. Plant Sci.* *5*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00117>.
- Cui, X., Lu, F., Qiu, Q., Zhou, B., Gu, L., Zhang, S., Kang, Y., Cui, X., Ma, X., Yao, Q., et al. (2016). REF6 recognizes a specific DNA sequence to demethylate H3K27me3 and regulate organ boundary formation in Arabidopsis. *Nat. Genet.* *48*, 694–699. <https://doi.org/10.1038/ng.3556>.
- De Lucia, F., Crevillén, P., Jones, A.M.E., Greb, T., and Dean, C. (2008). A PHD-Polycomb Repressive Complex 2 triggers the epigenetic silencing of FLC during vernalization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 16831–16836. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808687105>.

Deal, R.B., and Henikoff, S. (2011). The INTACT method for cell type-specific gene expression and chromatin profiling in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Protoc.* *6*, 56–68. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.175>.

Dekkers, B.J.W., Willems, L., Bassel, G.W., van Bolderen-Veldkamp, R.P. (Marieke), Ligterink, W., Hilhorst, H.W.M., and Bentsink, L. (2012). Identification of Reference Genes for RT-qPCR Expression Analysis in *Arabidopsis* and Tomato Seeds. *Plant Cell Physiol.* *53*, 28–37. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr113>.

del Olmo, I., López, J.A., Vázquez, J., Raynaud, C., Piñeiro, M., and Jarillo, J.A. (2016). *Arabidopsis* DNA polymerase ϵ recruits components of Polycomb repressor complex to mediate epigenetic gene silencing. *Nucleic Acids Res.* *44*, 5597–5614. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw156>.

Ding, Y., Avramova, Z., and Fromm, M. (2011). Two Distinct Roles of ARABIDOPSIS HOMOLOG OF TRITHORAX1 (ATX1) at Promoters and within Transcribed Regions of ATX1-Regulated Genes. *Plant Cell* *23*, 350–363. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.080150>.

Ding, Y., Ndamukong, I., Xu, Z., Lapko, H., Fromm, M., and Avramova, Z. (2012). ATX1-Generated H3K4me3 Is Required for Efficient Elongation of Transcription, Not Initiation, at ATX1-Regulated Genes. *PLOS Genet.* *8*, e1003111. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003111>.

Ditta, G., Pinyopich, A., Robles, P., Pelaz, S., and Yanofsky, M.F. (2004). The SEP4 Gene of *Arabidopsis thaliana* Functions in Floral Organ and Meristem Identity. *Curr. Biol.* *14*, 1935–1940. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.10.028>.

Durbak, A.R., and Tax, F.E. (2011). CLAVATA Signaling Pathway Receptors of *Arabidopsis* Regulate Cell Proliferation in Fruit Organ Formation as well as in Meristems. *Genetics* *189*, 177–194. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.130930>.

Eberharter, A., and Becker, P.B. (2002). Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep.* *3*, 224–229. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf053>.

Efroni, I., Han, S.-K., Kim, H.J., Wu, M.-F., Steiner, E., Birnbaum, K.D., Hong, J.C., Eshed, Y., and Wagner, D. (2013). Regulation of Leaf Maturation by Chromatin-Mediated Modulation of Cytokinin Responses. *Dev. Cell* *24*, 438–445. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.01.019>.

Engelhorn, J., Blanvillain, R., and Carles, C.C. (2014). Gene activation and cell fate control in plants: a chromatin perspective. *Cell. Mol. Life Sci.* *71*, 3119–3137. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1609-0>.

Engelhorn, J., Blanvillain, R., Kröner, C., Parrinello, H., Rohmer, M., Posé, D., Ott, F., Schmid, M., and Carles, C.C. (2017). Dynamics of H3K4me3 Chromatin Marks Prevails over H3K27me3 for Gene Regulation during Flower Morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Epigenomes* *1*, 8. <https://doi.org/10.3390/epigenomes1020008>.

Eshed Williams, L. (2021). Genetics of Shoot Meristem and Shoot Regeneration. *Annu. Rev. Genet.* 55, 661–681. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-071719-020439>.

Farrona, S., Hurtado, L., and Reyes, J.C. (2007). A Nucleosome Interaction Module Is Required for Normal Function of *Arabidopsis thaliana* BRAHMA. *J. Mol. Biol.* 373, 240–250. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.07.012>.

Farrona, S., Hurtado, L., March-Diaz, R., Schmitz, R.J., Florencio, F.J., Turck, F., Amasino, R.M., and Reyes, J.C. (2011). Brahma Is Required for Proper Expression of the Floral Repressor FLC in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* 6, e17997. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017997>.

Finogenova, K., Bonnet, J., Poepsel, S., Schäfer, I.B., Finkl, K., Schmid, K., Litz, C., Strauss, M., Benda, C., and Müller, J. (2020). Structural basis for PRC2 decoding of active histone methylation marks H3K36me_{2/3}. *ELife* 9, e61964. <https://doi.org/10.7554/eLife.61964>.

Fletcher, J.C. (2001). The ULTRAPETALA gene controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Development* 128, 1323–1333. .

Fletcher, J.C., Brand, U., Running, M.P., Simon, R., and Meyerowitz, E.M. (1999). Signaling of Cell Fate Decisions by CLAVATA3 in *Arabidopsis* Shoot Meristems. *Science* 283, 1911–1914. <https://doi.org/10.1126/science.283.5409.1911>.

Foroozani, M., Vandal, M.P., and Smith, A.P. (2021). H3K4 trimethylation dynamics impact diverse developmental and environmental responses in plants. *Planta* 253, 4. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03520-0>.

Galvão, V.C., Horrer, D., Küttner, F., and Schmid, M. (2012). Spatial control of flowering by DELLA proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Dev. Camb. Engl.* 139, 4072–4082. <https://doi.org/10.1242/dev.080879>.

Gan, E.-S., Xu, Y., Wong, J.-Y., Geraldine Goh, J., Sun, B., Wee, W.-Y., Huang, J., and Ito, T. (2014). Jumonji demethylases moderate precocious flowering at elevated temperature via regulation of FLC in *Arabidopsis*. *Nat. Commun.* 5, 5098. <https://doi.org/10.1038/ncomms6098>.

Gangappa, S.N., and Botto, J.F. (2014). The BBX family of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* 19, 460–470. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.01.010>.

Gocal, G.F., Sheldon, C.C., Gubler, F., Moritz, T., Bagnall, D.J., MacMillan, C.P., Li, S.F., Parish, R.W., Dennis, E.S., Weigel, D., et al. (2001). GAMYB-like genes, flowering, and gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127, 1682–1693. .

Godwin, J., and Farrona, S. (2022). The Importance of Networking: Plant Polycomb Repressive Complex 2 and Its Interactors. *Epigenomes* 6, 8. <https://doi.org/10.3390/epigenomes6010008>.

Gómez-Zambrano, Á., Merini, W., and Calonje, M. (2019). The repressive role of *Arabidopsis* H2A.Z in transcriptional regulation depends on AtBMI1 activity. *Nat. Commun.* 10, 2828. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10773-1>.

- Goodrich, J., Puangsomlee, P., Martin, M., Long, D., Meyerowitz, E.M., and Coupland, G. (1997). A Polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in Arabidopsis. *Nature* 386, 44–51. <https://doi.org/10.1038/386044a0>.
- Gramzow, L., and Theissen, G. (2010). A hitchhiker's guide to the MADS world of plants. *Genome Biol.* 11, 214. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-6-214>.
- Griffiths, J., Murase, K., Rieu, I., Zentella, R., Zhang, Z.-L., Powers, S.J., Gong, F., Phillips, A.L., Hedden, P., Sun, T., et al. (2006). Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in Arabidopsis. *Plant Cell* 18, 3399–3414. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.047415>.
- Grigorova, B., Mara, C., Hollender, C., Sijacic, P., Chen, X., and Liu, Z. (2011). LEUNIG and SEUSS co-repressors regulate miR172 expression in Arabidopsis flowers. *Development* 138, 2451–2456. <https://doi.org/10.1242/dev.058362>.
- Grimaud, C., Nègre, N., and Cavalli, G. (2006). From genetics to epigenetics: the tale of Polycomb group and trithorax group genes. *Chromosome Res.* 14, 363–375. <https://doi.org/10.1007/s10577-006-1069-y>.
- Gu, X., Jiang, D., Yang, W., Jacob, Y., Michaels, S.D., and He, Y. (2011). Arabidopsis Homologs of Retinoblastoma-Associated Protein 46/48 Associate with a Histone Deacetylase to Act Redundantly in Chromatin Silencing. *PLOS Genet.* 7, e1002366. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002366>.
- Guo, L., Cao, X., Liu, Y., Li, J., Li, Y., Li, D., Zhang, K., Gao, C., Dong, A., and Liu, X. (2018). A chromatin loop represses WUSCHEL expression in Arabidopsis. *Plant J.* 94, 1083–1097. <https://doi.org/10.1111/tpj.13921>.
- Han, S.-K., Wu, M.-F., Cui, S., and Wagner, D. (2015). Roles and activities of chromatin remodeling ATPases in plants. *Plant J.* 83, 62–77. <https://doi.org/10.1111/tpj.12877>.
- Heidstra, R., and Sabatini, S. (2014). Plant and animal stem cells: similar yet different. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 301–312. <https://doi.org/10.1038/nrm3790>.
- Hennig, L., Bouveret, R., and Gruissem, W. (2005). MSI1-like proteins: an escort service for chromatin assembly and remodeling complexes. *Trends Cell Biol.* 15, 295–302. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.04.004>.
- Heo, J.B., and Sung, S. (2011). Vernalization-Mediated Epigenetic Silencing by a Long Intronic Noncoding RNA. *Science* 331, 76–79. <https://doi.org/10.1126/science.1197349>.
- Hong, E.-H., Jeong, Y.-M., Ryu, J.-Y., Amasino, R.M., Noh, B., and Noh, and Y.-S. (2009). Temporal and Spatial Expression Patterns of Nine Arabidopsis Genes Encoding Jumonji C-Domain Proteins. *Mol. Cells* 27, 481–490. <https://doi.org/10.1007/s10059-009-0054-7>.
- Hoppmann, V., Thorstensen, T., Kristiansen, P.E., Veiseth, S.V., Rahman, M.A., Finne, K., Aalen, R.B., and Aasland, R. (2011). The CW domain, a new histone recognition module in chromatin proteins. *EMBO J.* 30, 1939–1952. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.108>.

Hou, X., Zhou, J., Liu, C., Liu, L., Shen, L., and Yu, H. (2014). Nuclear factor Y-mediated H3K27me3 demethylation of the SOC1 locus orchestrates flowering responses of Arabidopsis. *Nat. Commun.* 5, 4601. <https://doi.org/10.1038/ncomms5601>.

Hu, H., and Du, J. (2022). Structure and mechanism of histone methylation dynamics in Arabidopsis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 67, 102211. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2022.102211>.

Hu, T., Manuela, D., Hinsch, V., and Xu, M. PICKLE associates with Histone Deacetylase 9 to mediate vegetative phase change in Arabidopsis. *New Phytol.* *n/a*. <https://doi.org/10.1111/nph.18174>.

Huang, Z., Shi, T., Zheng, B., Yumul, R.E., Liu, X., You, C., Gao, Z., Xiao, L., and Chen, X. (2017). APETALA2 antagonizes the transcriptional activity of AGAMOUS in regulating floral stem cells in Arabidopsis thaliana. *New Phytol.* 215, 1197–1209. <https://doi.org/10.1111/nph.14151>.

Hugues, A., Jacobs, C.S., and Roudier, F. (2020). Mitotic Inheritance of PRC2-Mediated Silencing: Mechanistic Insights and Developmental Perspectives. *Front. Plant Sci.* 11. .

Hurtado, L., Farrona, S., and Reyes, J.C. (2006). The putative SWI/SNF complex subunit BRAHMA activates flower homeotic genes in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol. Biol.* 62, 291–304. <https://doi.org/10.1007/s11103-006-9021-2>.

Jiang, D., and Berger, F. (2017). DNA replication-coupled histone modification maintains Polycomb gene silencing in plants. *Science* 357, 1146–1149. <https://doi.org/10.1126/science.aan4965>.

Jiang, D., Yang, W., He, Y., and Amasino, R.M. (2007). Arabidopsis Relatives of the Human Lysine-Specific Demethylase1 Repress the Expression of FWA and FLOWERING LOCUS C and Thus Promote the Floral Transition. *Plant Cell* 19, 2975–2987. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.052373>.

Jiao, L., and Liu, X. (2015). Structural basis of histone H3K27 trimethylation by an active polycomb repressive complex 2. *Science* 350, aac4383. <https://doi.org/10.1126/science.aac4383>.

Johnson, L., Mollah, S., Garcia, B.A., Muratore, T.L., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Jacobsen, S.E. (2004). Mass spectrometry analysis of Arabidopsis histone H3 reveals distinct combinations of post-translational modifications. *Nucleic Acids Res.* 32, 6511–6518. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh992>.

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., et al. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.

Justin, N., Zhang, Y., Tarricone, C., Martin, S.R., Chen, S., Underwood, E., De Marco, V., Haire, L.F., Walker, P.A., Reinberg, D., et al. (2016). Structural basis of oncogenic histone H3K27M inhibition of human polycomb repressive complex 2. *Nat. Commun.* 7, 11316. <https://doi.org/10.1038/ncomms11316>.

- Krizek, B.A., and Fletcher, J.C. (2005). Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide. *Nat. Rev. Genet.* *6*, 688–698. <https://doi.org/10.1038/nrg1675>.
- Krogan, N.T., Hogan, K., and Long, J.A. (2012). APETALA2 negatively regulates multiple floral organ identity genes in Arabidopsis by recruiting the co-repressor TOPLESS and the histone deacetylase HDA19. *Development* *139*, 4180–4190. <https://doi.org/10.1242/dev.085407>.
- Kumar, S.V., Lucyshyn, D., Jaeger, K.E., Alós, E., Alvey, E., Harberd, N.P., and Wigge, P.A. (2012). Transcription factor PIF4 controls the thermosensory activation of flowering. *Nature* *484*, 242–245. <https://doi.org/10.1038/nature10928>.
- Kwon, C.S., Chen, C., and Wagner, D. (2005). WUSCHEL is a primary target for transcriptional regulation by SPLAYED in dynamic control of stem cell fate in Arabidopsis. *Genes Dev.* *19*, 992–1003. <https://doi.org/10.1101/gad.1276305>.
- Kwon, C.S., Lee, D., Choi, G., and Chung, W.-I. (2009). Histone occupancy-dependent and -independent removal of H3K27 trimethylation at cold-responsive genes in Arabidopsis. *Plant J.* *60*, 112–121. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03938.x>.
- Lafos, M., Kroll, P., Hohenstatt, M.L., Thorpe, F.L., Clarenz, O., and Schubert, D. (2011). Dynamic Regulation of H3K27 Trimethylation during Arabidopsis Differentiation. *PLOS Genet.* *7*, e1002040. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002040>.
- Laux, T., Mayer, K.F., Berger, J., and Jurgens, G. (1996). The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in Arabidopsis. *Development* *122*, 87–96. <https://doi.org/10.1242/dev.122.1.87>.
- Law, J.A., and Jacobsen, S.E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.* *11*, 204–220. <https://doi.org/10.1038/nrg2719>.
- Leene, J.V., Eeckhout, D., Cannoot, B., Winne, N.D., Persiau, G., Slijke, E.V.D., Vercruyse, L., Dedeker, M., Verkest, A., Vandepoele, K., et al. (2015). An improved toolbox to unravel the plant cellular machinery by tandem affinity purification of Arabidopsis protein complexes. *Nat. Protoc.* *10*, 169–187. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.199>.
- Leibfried, A., To, J.P.C., Busch, W., Stehling, S., Kehle, A., Demar, M., Kieber, J.J., and Lohmann, J.U. (2005). WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature* *438*, 1172–1175. <https://doi.org/10.1038/nature04270>.
- Leng, X., Thomas, Q., Rasmussen, S.H., and Marquardt, S. (2020). A G(enomic)P(ositioning)S(ystem) for Plant RNAPII Transcription. *Trends Plant Sci.* *25*, 744–764. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.03.005>.
- Lenhard, M., and 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. <https://doi.org/10.1242/dev.00525>.

Lenhard, M., Jürgens, G., and Laux, T. (2002). The WUSCHEL and SHOOTMERISTEMLESS genes fulfil complementary roles in Arabidopsis shoot meristem regulation. *Development* 129, 3195–3206. <https://doi.org/10.1242/dev.129.13.3195>.

Levin, J.Z., Fletcher, J.C., Chen, X., and Meyerowitz, E.M. (1998). A Genetic Screen for Modifiers of UFO Meristem Activity Identifies Three Novel FUSED FLORAL ORGANS Genes Required for Early Flower Development in Arabidopsis. *Genetics* 149, 579–595. .

Li, C., Chen, C., Gao, L., Yang, S., Nguyen, V., Shi, X., Siminovitch, K., Kohalmi, S.E., Huang, S., Wu, K., et al. (2015). The Arabidopsis SWI2/SNF2 Chromatin Remodeler BRAHMA Regulates Polycomb Function during Vegetative Development and Directly Activates the Flowering Repressor Gene SVP. *PLOS Genet.* 11, e1004944. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004944>.

Li, C., Gu, L., Gao, L., Chen, C., Wei, C.-Q., Qiu, Q., Chien, C.-W., Wang, S., Jiang, L., Ai, L.-F., et al. (2016). Concerted genomic targeting of H3K27 demethylase REF6 and chromatin-remodeling ATPase BRM in *Arabidopsis*. *Nat. Genet.* 48, 687–693. <https://doi.org/10.1038/ng.3555>.

Li, G., Liu, S., Wang, J., He, J., Huang, H., Zhang, Y., and Xu, L. (2014). ISWI proteins participate in the genome-wide nucleosome distribution in Arabidopsis. *Plant J.* 78, 706–714. <https://doi.org/10.1111/tpj.12499>.

Li, Z., Fu, X., Wang, Y., Liu, R., and He, Y. (2018). Polycomb-mediated gene silencing by the BAH–EMF1 complex in plants. *Nat. Genet.* 50, 1254–1261. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0190-0>.

Liljegren, S.J., Gustafson-Brown, C., Pinyopich, A., Ditta, G.S., and Yanofsky, M.F. (1999). Interactions among APETALA1, LEAFY, and TERMINAL FLOWER1 Specify Meristem Fate. *Plant Cell* 11, 1007–1018. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.6.1007>.

Liu, C., Chen, H., Er, H.L., Soo, H.M., Kumar, P.P., Han, J.-H., Liou, Y.C., and Yu, H. (2008). Direct interaction of AGL24 and SOC1 integrates flowering signals in Arabidopsis. *Development* 135, 1481–1491. <https://doi.org/10.1242/dev.020255>.

Liu, C., Xi, W., Shen, L., Tan, C., and Yu, H. (2009). Regulation of Floral Patterning by Flowering Time Genes. *Dev. Cell* 16, 711–722. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.03.011>.

Liu, C., Lu, F., Cui, X., and Cao, X. (2010). Histone methylation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 395–420. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.091939>.

Liu, P., Zhang, S., Zhou, B., Luo, X., Zhou, X.F., Cai, B., Jin, Y.H., Niu, D., Lin, J., Cao, X., et al. (2019). The Histone H3K4 Demethylase JMJ16 Represses Leaf Senescence in Arabidopsis. *Plant Cell* 31, 430–443. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00693>.

Liu, X., Kim, Y.J., Müller, R., Yumul, R.E., Liu, C., Pan, Y., Cao, X., Goodrich, J., and Chen, X. (2011). AGAMOUS Terminates Floral Stem Cell Maintenance in Arabidopsis by Directly Repressing WUSCHEL through Recruitment of Polycomb Group Proteins. *Plant Cell* 23, 3654–3670. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.091538>.

- Lodha, M., Marco, C.F., and Timmermans, M.C.P. (2013). The ASYMMETRIC LEAVES complex maintains repression of KNOX homeobox genes via direct recruitment of Polycomb-repressive complex2. *Genes Dev.* 27, 596–601. <https://doi.org/10.1101/gad.211425.112>.
- Lohmann, J.U., Hong, R.L., Hobe, M., Busch, M.A., Parcy, F., Simon, R., and Weigel, D. (2001). A Molecular Link between Stem Cell Regulation and Floral Patterning in Arabidopsis. *Cell* 105, 793–803. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00384-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00384-1).
- Long, J.A., Moan, E.I., Medford, J.I., and Barton, M.K. (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the STM gene of Arabidopsis. *Nature* 379, 66–69. <https://doi.org/10.1038/379066a0>.
- Lopez-Vernaza, M., Yang, S., Müller, R., Thorpe, F., Leau, E. de, and Goodrich, J. (2012). Antagonistic Roles of SEPALLATA3, FT and FLC Genes as Targets of the Polycomb Group Gene CURLY LEAF. *PLOS ONE* 7, e30715. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030715>.
- Lu, F., Li, G., Cui, X., Liu, C., Wang, X.-J., and Cao, X. (2008). Comparative analysis of JmjC domain-containing proteins reveals the potential histone demethylases in Arabidopsis and rice. *J. Integr. Plant Biol.* 50, 886–896. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00692.x>.
- Lu, F., Cui, X., Zhang, S., Jenuwein, T., and Cao, X. (2011). *Arabidopsis* REF6 is a histone H3 lysine 27 demethylase. *Nat. Genet.* 43, 715. <https://doi.org/10.1038/ng.854>.
- de Lucas, M., Davière, J.-M., Rodríguez-Falcón, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J.M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blázquez, M.A., Titarenko, E., and Prat, S. (2008). A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* 451, 480–484. <https://doi.org/10.1038/nature06520>.
- Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251–260. <https://doi.org/10.1038/38444>.
- Luo, M., Yu, C.-W., Chen, F.-F., Zhao, L., Tian, G., Liu, X., Cui, Y., Yang, J.-Y., and Wu, K. (2012). Histone Deacetylase HDA6 Is Functionally Associated with AS1 in Repression of KNOX Genes in Arabidopsis. *PLOS Genet.* 8, e1003114. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003114>.
- Mahajan, M., and Yadav, R.K. (2020). Labeling and Sorting of Arabidopsis SAM Cell Populations to Capture Their Transcriptome Profile. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 2094, 39–47. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0183-9_5.
- Mandel, M., Gustafson-Brown, C., Savidge, B., and Yanofsky, M.F. (1992). Molecular characterization of the Arabidopsis floral homeotic gene APETALA1. *Nature* 360, 273–277. <https://doi.org/10.1038/360273a0>.
- Margueron, R., Justin, N., Ohno, K., Sharpe, M.L., Son, J., Drury III, W.J., Voigt, P., Martin, S.R., Taylor, W.R., De Marco, V., et al. (2009). Role of the polycomb protein EED in the propagation of repressive histone marks. *Nature* 461, 762–767. <https://doi.org/10.1038/nature08398>.

Mayer, K.F.X., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jürgens, G., and Laux, T. (1998). Role of WUSCHEL in Regulating Stem Cell Fate in the Arabidopsis Shoot Meristem. *Cell* 95, 805–815. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81703-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81703-1).

McKinley, K.L., and Cheeseman, I.M. (2016). The molecular basis for centromere identity and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 16–29. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.5>.

Michaels, S.D., He, Y., Scortecci, K.C., and Amasino, R.M. (2003). Attenuation of FLOWERING LOCUS C activity as a mechanism for the evolution of summer-annual flowering behavior in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 10102–10107. <https://doi.org/10.1073/pnas.1531467100>.

Michelson, R.J., Collard, M.W., Ziembra, A.J., Persinger, J., Bartholomew, B., and Huggenvik, J.I. (1999). Nuclear DEAF-1-related (NUDR) Protein Contains a Novel DNA Binding Domain and Represses Transcription of the Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A2/B1 Promoter *. *J. Biol. Chem.* 274, 30510–30519. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.43.30510>.

Monfared, M.M., and Fletcher, J.C. (2014). The ULT *trxG* factors play a role in arabidopsis fertilization. *Plant Signal. Behav.* 9. <https://doi.org/10.4161/15592324.2014.977723>.

Monfared, M.M., Carles, C.C., Rossignol, P., Pires, H.R., and Fletcher, J.C. (2013). The ULT1 and ULT2 *trxG* Genes Play Overlapping Roles in Arabidopsis Development and Gene Regulation. *Mol. Plant* 6, 1564–1579. <https://doi.org/10.1093/mp/sst041>.

Moon, J., Lee, H., Kim, M., and Lee, I. (2005). Analysis of flowering pathway integrators in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 46, 292–299. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci024>.

Moreau, F., Thévenon, E., Blanvillain, R., Lopez-Vidriero, I., Franco-Zorrilla, J.M., Dumas, R., Parcy, F., Morel, P., Trehin, C., and Carles, C.C. (2016). The Myb-domain protein ULTRAPETALA1 INTERACTING FACTOR 1 controls floral meristem activities in Arabidopsis. *Development* 143, 1108–1119. <https://doi.org/10.1242/dev.127365>.

Mosammaparast, N., and Shi, Y. (2010). Reversal of histone methylation: biochemical and molecular mechanisms of histone demethylases. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 155–179. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.070907.103946>.

Mozgova, I., and Hennig, L. (2015). The Polycomb Group Protein Regulatory Network. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66, 269–296. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-115627>.

Müller, J., and Kassis, J.A. (2006). Polycomb response elements and targeting of Polycomb group proteins in *Drosophila*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16, 476–484. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2006.08.005>.

Müller, R., Bleckmann, A., and Simon, R. (2008). The receptor kinase CORYNE of Arabidopsis transmits the stem cell-limiting signal CLAVATA3 independently of CLAVATA1. *Plant Cell* 20, 934–946. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.057547>.

Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* *15*, 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.

Ng, D.W.-K., Wang, T., Chandrasekharan, M.B., Aramayo, R., Kertbundit, S., and Hall, T.C. (2007). Plant SET domain-containing proteins: Structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.* *1769*, 316–329. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2007.04.003>.

Ni, J., and Clark, S.E. (2006). Evidence for Functional Conservation, Sufficiency, and Proteolytic Processing of the CLAVATA3 CLE Domain. *Plant Physiol.* *140*, 726–733. <https://doi.org/10.1104/pp.105.072678>.

Noh, B., Lee, S.-H., Kim, H.-J., Yi, G., Shin, E.-A., Lee, M., Jung, K.-J., Doyle, M.R., Amasino, R.M., and Noh, Y.-S. (2004). Divergent Roles of a Pair of Homologous Jumonji/Zinc-Finger-Class Transcription Factor Proteins in the Regulation of Arabidopsis Flowering Time. *Plant Cell* *16*, 2601–2613. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.025353>.

Ornelas-Ayala, D., Vega-León, R., Petrone-Mendoza, E., Garay-Arroyo, A., García-Ponce, B., Álvarez-Buylla, E.R., and Sanchez, M. de la P. (2020). ULTRAPETALA1 maintains Arabidopsis root stem cell niche independently of ARABIDOPSIS TRITHORAX1. *New Phytol.* *225*, 1261–1272. <https://doi.org/10.1111/nph.16213>.

Pandey, R., Müller, A., Napoli, C.A., Selinger, D.A., Pikaard, C.S., Richards, E.J., Bender, J., Mount, D.W., and Jorgensen, R.A. (2002). Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of Arabidopsis thaliana suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* *30*, 5036–5055. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf660>.

Parcy, F. (2004). Flowering: a time for integration. *Int. J. Dev. Biol.* *49*, 585–593. <https://doi.org/10.1387/ijdb.041930fp>.

Pazhouhandeh, M., Molinier, J., Berr, A., and Genschik, P. (2011). MSI4/FVE interacts with CUL4–DDB1 and a PRC2-like complex to control epigenetic regulation of flowering time in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 3430–3435. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018242108>.

Pelaz, S., Tapia-López, R., Alvarez-Buylla, E.R., and Yanofsky, M.F. (2001). Conversion of leaves into petals in Arabidopsis. *Curr. Biol.* *11*, 182–184. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00024-0](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00024-0).

Pérez-Pérez, J.M., Candela, H., and Micol, J.L. (2009). Understanding synergy in genetic interactions. *Trends Genet.* *25*, 368–376. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2009.06.004>.

Perry, J., and Zhao, Y. (2003). The CW domain, a structural module shared amongst vertebrates, vertebrate-infecting parasites and higher plants. *Trends Biochem. Sci.* *28*, 576–580. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2003.09.007>.

- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30, e36. <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.e36>.
- Pinyopich, A., Ditta, G.S., Savidge, B., Liljegren, S.J., Baumann, E., Wisman, E., and Yanofsky, M.F. (2003). Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature* 424, 85–88. <https://doi.org/10.1038/nature01741>.
- Pires, H.R., Monfared, M.M., Shemyakina, E.A., and Fletcher, J.C. (2014). *ULTRAPETALA* trxB Genes Interact with *KANADI* Transcription Factor Genes to Regulate *Arabidopsis* Gynoecium Patterning. *Plant Cell Online* 26, 4345–4361. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.131250>.
- Pires, H.R., Shemyakina, E.A., and Fletcher, J.C. (2015). The *ULTRAPETALA1* trxB factor contributes to patterning the *Arabidopsis* adaxial-abaxial leaf polarity axis. *Plant Signal. Behav.* 10. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1034422>.
- Pitkänen, J., Vähämurto, P., Krohn, K., and Peterson, P. (2001). Subcellular Localization of the Autoimmune Regulator Protein: CHARACTERIZATION OF NUCLEAR TARGETING AND TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION DOMAIN *. *J. Biol. Chem.* 276, 19597–19602. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008322200>.
- Poepsel, S., Kasinath, V., and Nogales, E. (2018). Cryo-EM structures of PRC2 simultaneously engaged with two functionally distinct nucleosomes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 25, 154–162. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0023-y>.
- Prunet, N., Morel, P., Thierry, A.-M., Eshed, Y., Bowman, J.L., Negrutiu, I., and 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. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.053306>.
- Pu, L., Liu, M.-S., Kim, S.Y., Chen, L.-F.O., Fletcher, J.C., and Sung, Z.R. (2013). *EMBRYONIC FLOWER1* and *ULTRAPETALA1* Act Antagonistically on *Arabidopsis* Development and Stress Response. *Plant Physiol.* 162, 812–830. <https://doi.org/10.1104/pp.112.213223>.
- Qüesta, J.I., Song, J., Geraldo, N., An, H., and Dean, C. (2016). *Arabidopsis* transcriptional repressor *VAL1* triggers Polycomb silencing at *FLC* during vernalization. *Science* 353, 485–488. <https://doi.org/10.1126/science.aaf7354>.
- Reinhardt, D., Mandel, T., and Kuhlemeier, C. (2000). Auxin Regulates the Initiation and Radial Position of Plant Lateral Organs. *Plant Cell* 12, 507–518. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.4.507>.
- Reyes-Olalde, J.I., and de Folter, S. (2019). Control of stem cell activity in the carpel margin meristem (CMM) in *Arabidopsis*. *Plant Reprod.* 32, 123–136. <https://doi.org/10.1007/s00497-018-00359-0>.
- Richter, R., Kinoshita, A., Vincent, C., Martinez-gallegos, R., Gao, H., Driel, A.D. Van, Hyun, Y., Mateos, J.L., and Coupland, G. (2019). Floral regulators *FLC* and *SOC1* directly regulate expression of the B3-type transcription factor *TARGET OF FLC AND SVP 1* at the *Arabidopsis*

shoot apex via antagonistic chromatin modifications. *PLoS Genet.* *15*, e1008065. <https://doi.org/10.5061/dryad.b0j2td6>.

Roudier, F., Ahmed, I., Bérard, C., Sarazin, A., Mary-Huard, T., Cortijo, S., Bouyer, D., Caillieux, E., Duvernois-Berthet, E., Al-Shikhley, L., et al. (2011). Integrative epigenomic mapping defines four main chromatin states in Arabidopsis. *EMBO J.* *30*, 1928–1938. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.103>.

Roy, D., Chakrabarty, J., Mallik, R., and Chaudhuri, S. (2019). Rice Trithorax factor ULTRAPETALA 1 (OsULT1) specifically binds to “GAGAG” sequence motif present in Polycomb response elements. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2019.02.001>.

Rutowicz, K., Lirski, M., Mermaz, B., Teano, G., Schubert, J., Mestiri, I., Kroteń, M.A., Fabrice, T.N., Fritz, S., Grob, S., et al. (2019). Linker histones are fine-scale chromatin architects modulating developmental decisions in Arabidopsis. *Genome Biol.* *20*, 1–22. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1767-3>.

Sakamoto, T., Tsujimoto-inui, Y., Sotta, N., Hirakawa, T., Matsunaga, T.M., Fukao, Y., Matsunaga, S., and Fujiwara, T. (2018). Proteasomal degradation of BRAHMA promotes Boron tolerance in Arabidopsis. *Nat. Commun.* *9*, 5285. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07393-6>.

Saleh, A., Alvarez-Venegas, R., Yilmaz, M., Le, O., Hou, G., Sadler, M., Al-Abdallat, A., Xia, Y., Lu, G., Ladunga, I., et al. (2008). The Highly Similar Arabidopsis Homologs of Trithorax ATX1 and ATX2 Encode Proteins with Divergent Biochemical Functions. *Plant Cell* *20*, 568–579. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.056614>.

Sanchez-Pulido, L., Devos, D., Sung, Z.R., and Calonje, M. (2008). RAWUL: a new ubiquitin-like domain in PRC1 ring finger proteins that unveils putative plant and worm PRC1 orthologs. *BMC Genomics* *9*, 308. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-308>.

Sawa, M., Nusinow, D.A., Kay, S.A., and Imaizumi, T. (2007). FKF1 and GIGANTEA Complex Formation Is Required for Day-Length Measurement in Arabidopsis. *Science* *318*, 261–265. <https://doi.org/10.1126/science.1146994>.

Schmalenbach, I., Zhang, L., Ryngajllo, M., and Jiménez-Gómez, J.M. (2014). Functional analysis of the Landsberg erecta allele of FRIGIDA. *BMC Plant Biol.* *14*, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0218-2>.

Schmitges, F.W., Prusty, A.B., Faty, M., Stützer, A., Lingaraju, G.M., Aiwazian, J., Sack, R., Hess, D., Li, L., Zhou, S., et al. (2011). Histone Methylation by PRC2 Is Inhibited by Active Chromatin Marks. *Mol. Cell* *42*, 330–341. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.03.025>.

Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K.F.X., Jürgens, G., and 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*, 635–644. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80700-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80700-X).

Schuettengruber, B., Bourbon, H.-M., Di Croce, L., and Cavalli, G. (2017). Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting. *Cell* 171, 34–57. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.002>.

Schwab, R., Palatnik, J.F., Riester, M., Schommer, C., Schmid, M., and Weigel, D. (2005). Specific Effects of MicroRNAs on the Plant Transcriptome. *Dev. Cell* 8, 517–527. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.01.018>.

Searle, I., He, Y., Turck, F., Vincent, C., Fornara, F., Kröber, S., Amasino, R.A., and Coupland, G. (2006). The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in Arabidopsis. *Genes Dev.* 20, 898–912. <https://doi.org/10.1101/gad.373506>.

Sequeira-Mendes, J., Aragüez, I., Peiró, R., Mendez-Giraldez, R., Zhang, X., Jacobsen, S.E., Bastolla, U., and Gutierrez, C. (2014). The Functional Topography of the Arabidopsis Genome Is Organized in a Reduced Number of Linear Motifs of Chromatin States. *Plant Cell* 26, 2351–2366. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.124578>.

Shang, J.-Y., Lu, Y.-J., Cai, X.-W., Su, Y.-N., Feng, C., Li, L., Chen, S., and He, X.-J. (2021). COMPASS functions as a module of the INO80 chromatin remodeling complex to mediate histone H3K4 methylation in Arabidopsis. *Plant Cell* 33, 3250–3271. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab187>.

Sharaf, A., Vijayanathan, M., Oborník, M., and Mozgová, I. (2022). Phylogenetic profiling resolves early emergence of PRC2 and illuminates its functional core. *Life Sci. Alliance* 5. <https://doi.org/10.26508/lsa.202101271>.

Shi, B., and Vernoux, T. (2022). Hormonal control of cell identity and growth in the shoot apical meristem. *Curr. Opin. Plant Biol.* 65, 102111. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102111>.

Shu, J., Chen, C., Thapa, R.K., Bian, S., Nguyen, V., Yu, K., Yuan, Z.-C., Liu, J., Kohalmi, S.E., Li, C., et al. (2019). Genome-wide occupancy of histone H3K27 methyltransferases CURLY LEAF and SWINGER in Arabidopsis seedlings. *Plant Direct* 3, e00100. <https://doi.org/10.1002/pld3.100>.

Shu, J., Chen, C., Li, C., and Cui, Y. (2020). The complexity of PRC2 catalysts CLF and SWN in plants. *Biochem. Soc. Trans.* 48, 2779–2789. <https://doi.org/10.1042/BST20200660>.

Skoog, F., and Miller, C.O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11, 118–130. .

Smaczniak, C., Immink, R.G.H., Muiño, J.M., Blanvillain, R., Busscher, M., Busscher-Lange, J., Dinh, Q.D. (Peter), Liu, S., Westphal, A.H., Boeren, S., et al. (2012). Characterization of MADS-domain transcription factor complexes in Arabidopsis flower development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 1560–1565. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112871109>.

Sridhar, V.V., Surendrarao, A., and Liu, Z. (2006). APETALA1 and SEPALLATA3 interact with SEUSS to mediate transcription repression during flower development. *Development* 133, 3159–3166. <https://doi.org/10.1242/dev.02498>.

Steeves, T.A., and Sussex, I.M. (1989). *Patterns in Plant Development* (Cambridge: Cambridge University Press).

Su, Y., Kwon, C.S., Bezhani, S., Huvermann, B., Chen, C., Peragine, A., Kennedy, J.F., and Wagner, D. (2006). The N-terminal ATPase AT-hook-containing region of the Arabidopsis chromatin-remodeling protein SPLAYED is sufficient for biological activity. *Plant J.* *46*, 685–699. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02734.x>.

Sun, B., Looi, L.-S., Guo, S., He, Z., Gan, E.-S., Huang, J., Xu, Y., Wee, W.-Y., and Ito, T. (2014). Timing mechanism dependent on cell division is invoked by Polycomb eviction in plant stem cells. *Science* *343*, 1248559. <https://doi.org/10.1126/science.1248559>.

Sun, B., Zhou, Y., Cai, J., Shang, E., Yamaguchi, N., Xiao, J., Looi, L.-S., Wee, W.-Y., Gao, X., Wagner, D., et al. (2019). Integration of Transcriptional Repression and Polycomb-Mediated Silencing of WUSCHEL in Floral Meristems. *Plant Cell* *31*, 1488–1505. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00450>.

Sung, S., and Amasino, R.M. (2004). Vernalization in Arabidopsis thaliana is mediated by the PHD finger protein VIN3. *Nature* *427*, 159–164. <https://doi.org/10.1038/nature02195>.

Suzuki, M., Wang, H.H.-Y., and McCarty, D.R. (2007). Repression of the LEAFY COTYLEDON 1/B3 Regulatory Network in Plant Embryo Development by VP1/ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3-LIKE B3 Genes. *Plant Physiol.* *143*, 902–911. <https://doi.org/10.1104/pp.106.092320>.

Szymkowiak, E.J., and Sussex, I.M. (1996). WHAT CHIMERAS CAN TELL US ABOUT PLANT DEVELOPMENT. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* *47*, 351–376. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.351>.

Tamkun, J.W., Deuring, R., Scott, M.P., Kissinger, M., Pattatucci, A.M., Kaufman, T.C., and Kennison, J.A. (1992). brahma: a regulator of Drosophila homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell* *68*, 561–572. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90191-e](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90191-e).

Theißen, G., and Saedler, H. (2001). Floral quartets. *Nature* *409*, 469–471. <https://doi.org/10.1038/35054172>.

Thouly, C., Le Masson, M., Lai, X., Carles, C.C., and Vachon, G. (2020). Unwinding BRAHMA Functions in Plants. *Genes* *11*, 90. <https://doi.org/10.3390/genes11010090>.

Tian, J., Xing, Q., Jing, T., Fan, X., Zhang, Q., and Müller-Xing, R. (2022). The epigenetic regulator ULTRAPETALA1 suppresses de novo root regeneration from Arabidopsis leaf explants. *Plant Signal. Behav.* *0*, null. <https://doi.org/10.1080/15592324.2022.2031784>.

Torok, M., and Etkin, L.D. (2001). Two B or not two B? Overview of the rapidly expanding B-box family of proteins. *Differentiation* *67*, 63–71. <https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2001.067003063.x>.

Torres, E.S., and Deal, R.B. (2019). The histone variant H2A . Z and chromatin remodeler BRAHMA act coordinately and antagonistically to regulate transcription and nucleosome dynamics in Arabidopsis. *Plant J.* *99*, 144–162. <https://doi.org/10.1111/tpj.14281>.

Turck, F., Roudier, F., Farrona, S., Martin-Magniette, M.-L., Guillaume, E., Buisine, N., Gagnot, S., Martienssen, R.A., Coupland, G., and Colot, V. (2007). Arabidopsis TFL2/LHP1 Specifically Associates with Genes Marked by Trimethylation of Histone H3 Lysine 27. *PLOS Genet.* *3*, e86. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030086>.

Tyler, L., Miller, M.J., and Fletcher, J.C. (2019). The Trithorax Group Factor ULTRAPETALA1 Regulates Developmental as Well as Biotic and Abiotic Stress Response Genes in Arabidopsis. *G3 GenesGenomesGenetics* *9*, 4029 LP – 4043. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400559>.

Uemura, A., Yamaguchi, N., Xu, Y., Wee, W., Ichihashi, Y., Suzuki, T., Shibata, A., Shirasu, K., and Ito, T. (2018). Regulation of floral meristem activity through the interaction of AGAMOUS, SUPERMAN, and CLAVATA3 in Arabidopsis. *Plant Reprod.* *31*, 89–105. <https://doi.org/10.1007/s00497-017-0315-0>.

Vachon, G., Engelhorn, J., and Carles, C.C. (2018). Interactions between transcription factors and chromatin regulators in the control of flower development. *J. Exp. Bot.* *69*, 2461–2471. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery079>.

Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., et al. (2022). AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res.* *50*, D439–D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>.

Velanis, C.N., Perera, P., Thomson, B., Leau, E. de, Liang, S.C., Hartwig, B., Förderer, A., Thornton, H., Arede, P., Chen, J., et al. (2020). The domesticated transposase ALP2 mediates formation of a novel Polycomb protein complex by direct interaction with MSI1, a core subunit of Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2). *PLOS Genet.* *16*, e1008681. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008681>.

Veluchamy, A., Jégu, T., Ariel, F., Latrasse, D., Mariappan, K.G., Kim, S.-K., Crespi, M., Hirt, H., Bergounioux, C., Raynaud, C., et al. (2016). LHP1 Regulates H3K27me3 Spreading and Shapes the Three-Dimensional Conformation of the Arabidopsis Genome. *PLOS ONE* *11*, e0158936. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158936>.

Vijayanathan, M., Trejo-Arellano, M.G., and Mozgová, I. (2022). Polycomb Repressive Complex 2 in Eukaryotes—An Evolutionary Perspective. *Epigenomes* *6*, 3. <https://doi.org/10.3390/epigenomes6010003>.

Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R.S., and Zhang, Y. (2004). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* *431*, 873–878. <https://doi.org/10.1038/nature02985>.

Wang, H., Liu, C., Cheng, J., Liu, J., Zhang, L., He, C., Shen, W.-H., Jin, H., Xu, L., and Zhang, Y. (2016). Arabidopsis Flower and Embryo Developmental Genes are Repressed in Seedlings by Different Combinations of Polycomb Group Proteins in Association with Distinct Sets of Cis-

regulatory Elements. PLOS Genet. 12, e1005771.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005771>.

Wu, G., Park, M.Y., Conway, S.R., Wang, J.-W., Weigel, D., and Poethig, R.S. (2009). The Sequential Action of miR156 and miR172 Regulates Developmental Timing in Arabidopsis. *Cell* 138, 750–759. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.031>.

Wu, H.-W., Deng, S., Xu, H., Mao, H.-Z., Liu, J., Niu, Q.-W., Wang, H., and Chua, N.-H. (2018). A noncoding RNA transcribed from the AGAMOUS (AG) second intron binds to CURLY LEAF and represses AG expression in leaves. *New Phytol.* 219, 1480–1491. <https://doi.org/10.1111/nph.15231>.

Wu, M.-F., Sang, Y., Bezhani, S., Yamaguchi, N., Han, S.-K., Li, Z., Su, Y., Slewinski, T.L., and Wagner, D. (2012). SWI2/SNF2 chromatin remodeling ATPases overcome polycomb repression and control floral organ identity with the LEAFY and SEPALLATA3 transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 3576–3581. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113409109>.

Wu, Z., Fang, X., Zhu, D., and Dean, C. (2020). Autonomous pathway: FLOWERING LOCUS C repression through an antisense-mediated chromatin silencing mechanism. *Plant Physiol.* <https://doi.org/10.1104/pp.19.01009>.

Würschum, T., Groß-Hardt, R., and Laux, T. (2006). APETALA2 Regulates the Stem Cell Niche in the Arabidopsis Shoot Meristem. *Plant Cell* 18, 295–307. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.038398>.

Xiao, J., Lee, U.-S., and Wagner, D. (2016). Tug of war: adding and removing histone lysine methylation in Arabidopsis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 34, 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.08.002>.

Xiao, J., Jin, R., Yu, X., Shen, M., Wagner, J.D., Pai, A., Song, C., Zhuang, M., Klasfeld, S., He, C., et al. (2017). Cis and trans determinants of epigenetic silencing by Polycomb repressive complex 2 in Arabidopsis. *Nat. Genet.* 49, 1546–1552. <https://doi.org/10.1038/ng.3937>.

Xie, M., Chen, H., Huang, L., O’Neil, R.C., Shokhirev, M.N., and Ecker, J.R. (2018). A B-ARR-mediated cytokinin transcriptional network directs hormone cross-regulation and shoot development. *Nat. Commun.* 9, 1604. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03921-6>.

Xu, L., and Shen, W.-H. (2008). Polycomb Silencing of KNOX Genes Confines Shoot Stem Cell Niches in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 18, 1966–1971. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.11.019>.

Xu, F., Kuo, T., Rosli, Y., Liu, M.-S., Wu, L., Chen, L.-F.O., Fletcher, J.C., Sung, Z.R., and Pu, L. (2018a). Trithorax Group Proteins Act Together with a Polycomb Group Protein to Maintain Chromatin Integrity for Epigenetic Silencing during Seed Germination in Arabidopsis. *Mol. Plant* 11, 659–677. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.01.010>.

Xu, L., Zhao, Z., Dong, A., Soubigou-Taconnat, L., Renou, J.-P., Steinmetz, A., and Shen, W.-H. (2008). Di- and Tri- but Not Monomethylation on Histone H3 Lysine 36 Marks Active Transcription of Genes Involved in Flowering Time Regulation and Other Processes in Arabidopsis thaliana. *Mol. Cell. Biol.* 28, 1348–1360. <https://doi.org/10.1128/MCB.01607-07>.

Xu, M., Hu, T., Smith, M.R., and Poethig, R.S. (2016a). Epigenetic Regulation of Vegetative Phase Change in Arabidopsis. *Plant Cell* 28, 28–41. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00854>.

Xu, Y., Guo, C., Zhou, B., Li, C., Wang, H., Zheng, B., Ding, H., Zhu, Z., Peragine, A., Cui, Y., et al. (2016b). Regulation of Vegetative Phase Change by SWI2 / SNF2 Chromatin Remodeling ATPase BRAHMA. *Plant Physiol.* 172, 2416–2428. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01588>.

Xu, Y., Prunet, N., Gan, E.-S., Wang, Y., Stewart, D., Wellmer, F., Huang, J., Yamaguchi, N., Tatsumi, Y., Kojima, M., et al. (2018b). SUPERMAN regulates floral whorl boundaries through control of auxin biosynthesis. *EMBO J.* 37, e97499. <https://doi.org/10.15252/embj.201797499>.

Xu, Y., Yamaguchi, N., Gan, E.-S., and Ito, T. (2019). When to stop: an update on molecular mechanisms of floral meristem termination. *J. Exp. Bot.* 70, 1711–1718. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz048>.

Xu, Y., Li, Q., Yuan, L., Huang, Y., Hung, F.-Y., Wu, K., and Yang, S. (2022). MSI1 and HDA6 function interdependently to control flowering time via chromatin modifications. *Plant J.* 109, 831–843. <https://doi.org/10.1111/tpj.15596>.

Yadav, R.K., Girke, T., Pasala, S., Xie, M., and Reddy, G.V. (2009). Gene expression map of the Arabidopsis shoot apical meristem stem cell niche. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 4941–4946. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900843106>.

Yadav, R.K., Perales, M., Gruel, J., Girke, T., Jönsson, H., and Reddy, G.V. (2011). WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the Arabidopsis shoot apex. *Genes Dev.* 25, 2025–2030. <https://doi.org/10.1101/gad.17258511>.

Yamaguchi, N., Huang, J., Xu, Y., Tanoi, K., and Ito, T. (2017). Fine-tuning of auxin homeostasis governs the transition from floral stem cell maintenance to gynoecium formation. *Nat. Commun.* 8, 1125. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01252-6>.

Yan, W., Chen, D., Smaczniak, C., Engelhorn, J., Liu, H., Yang, W., Graf, A., Carles, C.C., Zhou, D.-X., and Kaufmann, K. (2018). Dynamic and spatial restriction of Polycomb activity by plant histone demethylases. *Nat. Plants* 4, 681–689. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0219-5>.

Yanai, O., Shani, E., Dolezal, K., Tarkowski, P., Sablowski, R., Sandberg, G., Samach, A., and Ori, N. (2005). Arabidopsis KNOX1 Proteins Activate Cytokinin Biosynthesis. *Curr. Biol.* 15, 1566–1571. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.07.060>.

Yang, C., Bratzel, F., Hohmann, N., Koch, M., Turck, F., and Calonje, M. (2013). VAL- and AtBMI1-Mediated H2Aub Initiate the Switch from Embryonic to Postgerminative Growth in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 23, 1324–1329. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.05.050>.

Yang, H., Han, Z., Cao, Y., Fan, D., Li, H., Mo, H., Feng, Y., Liu, L., Wang, Z., Yue, Y., et al. (2012). A Companion Cell-Dominant and Developmentally Regulated H3K4 Demethylase Controls Flowering Time in Arabidopsis via the Repression of FLC Expression. *PLOS Genet.* 8, e1002664. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002664>.

- Yang, H., Howard, M., and Dean, C. (2016). Physical coupling of activation and derepression activities to maintain an active transcriptional state at FLC. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *113*, 9369–9374. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605733113>.
- Yang, H., Berry, S., Olsson, T.S.G., Hartley, M., Howard, M., and Dean, C. (2017). Distinct phases of Polycomb silencing to hold epigenetic memory of cold in Arabidopsis. *Science* *357*, 1142–1145. <https://doi.org/10.1126/science.aan1121>.
- Yang, S., Li, C., Zhao, L., Gao, S., Lu, J., Zhao, M., Chen, C.-Y., Liu, X., Luo, M., Cui, Y., et al. (2015). The Arabidopsis SWI2/SNF2 Chromatin Remodeling ATPase BRAHMA Targets Directly to PINs and Is Required for Root Stem Cell Niche Maintenance. *Plant Cell* *27*, 1670–1680. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00091>.
- Yant, L., Mathieu, J., Dinh, T.T., Ott, F., Lanz, C., Wollmann, H., Chen, X., and Schmid, M. (2010). Orchestration of the floral transition and floral development in Arabidopsis by the bifunctional transcription factor APETALA2. *Plant Cell* *22*, 2156–2170. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.075606>.
- Yelagandula, R., Stroud, H., Holec, S., Zhou, K., Feng, S., Zhong, X., Muthurajan, U.M., Nie, X., Kawashima, T., Groth, M., et al. (2014). The Histone Variant H2A.W Defines Heterochromatin and Promotes Chromatin Condensation in Arabidopsis. *Cell* *158*, 98–109. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.006>.
- You, Y., Sawikowska, A., Neumann, M., Posé, D., Capovilla, G., Langenecker, T., Neher, R.A., Krajewski, P., and Schmid, M. (2017). Temporal dynamics of gene expression and histone marks at the Arabidopsis shoot meristem during flowering. *Nat. Commun.* *8*, 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms15120>.
- Yu, C.-W., Liu, X., Luo, M., Chen, C., Lin, X., Tian, G., Lu, Q., Cui, Y., and Wu, K. (2011). HISTONE DEACETYLASE6 Interacts with FLOWERING LOCUS D and Regulates Flowering in Arabidopsis. *Plant Physiol.* *156*, 173–184. <https://doi.org/10.1104/pp.111.174417>.
- Yu, H., Ito, T., Wellmer, F., and Meyerowitz, E.M. (2004). Repression of AGAMOUS-LIKE 24 is a crucial step in promoting flower development. *Nat. Genet.* *36*, 157–161. <https://doi.org/10.1038/ng1286>.
- Yu, S., Galvão, V.C., Zhang, Y.-C., Horrer, D., Zhang, T.-Q., Hao, Y.-H., Feng, Y.-Q., Wang, S., Schmid, M., and Wang, J.-W. (2012). Gibberellin regulates the Arabidopsis floral transition through miR156-targeted SQUAMOSA promoter binding-like transcription factors. *Plant Cell* *24*, 3320–3332. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.101014>.
- Yu, Y., Liang, Z., Song, X., Fu, W., Xu, J., Lei, Y., Yuan, L., Ruan, J., Chen, C., Fu, W., et al. (2020). BRAHMA-interacting proteins BRIP1 and BRIP2 are core subunits of Arabidopsis SWI/SNF complexes. *Nat. Plants* *6*, 996–1007. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0734-z>.
- Zaware, N., and Zhou, M.-M. (2019). Bromodomain biology and drug discovery. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *26*, 870–879. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0309-8>.

- Zhang, H., Bishop, B., Ringenberg, W., Muir, W.M., and Ogas, J. (2012). The CHD3 remodeler PICKLE associates with genes enriched for trimethylation of histone H3 lysine 27. *Plant Physiol.* *159*, 418–432. <https://doi.org/10.1104/pp.112.194878>.
- Zhang, K., Wang, R., Zi, H., Li, Y., Cao, X., Li, D., Guo, L., Tong, J., Pan, Y., Jiao, Y., et al. (2018). AUXIN RESPONSE FACTOR3 Regulates Floral Meristem Determinacy by Repressing Cytokinin Biosynthesis and Signaling. *Plant Cell* *30*, 324–346. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00705>.
- Zhang, X., Germann, S., Blus, B.J., Khorasanizadeh, S., Gaudin, V., and Jacobsen, S.E. (2007). The Arabidopsis LHP1 protein colocalizes with histone H3 Lys27 trimethylation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *14*, 869–871. <https://doi.org/10.1038/nsmb1283>.
- Zhang, X., Bernatavichute, Y.V., Cokus, S., Pellegrini, M., and Jacobsen, S.E. (2009). Genome-wide analysis of mono-, di- and trimethylation of histone H3 lysine 4 in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol.* *10*, R62. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-6-r62>.
- Zhao, L., Kim, Y., Dinh, T.T., and 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03181.x>.
- Zhao, M., Yang, S., Chen, C.-Y., Li, C., Shan, W., Lu, W., Cui, Y., Liu, X., and Wu, K. (2015). Arabidopsis BREVIPEDICELLUS Interacts with the SWI2/SNF2 Chromatin Remodeling ATPase BRAHMA to Regulate KNAT2 and KNAT6 Expression in Control of Inflorescence Architecture. *PLOS Genet.* *11*, e1005125. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005125>.
- Zhao, Z., Yu, Y., Meyer, D., Wu, C., and Shen, W.-H. (2005). Prevention of early flowering by expression of FLOWERING LOCUS C requires methylation of histone H3 K36. *Nat. Cell Biol.* *7*, 1256–1260. <https://doi.org/10.1038/ncb1329>.
- Zheng, S., Hu, H., Ren, H., Yang, Z., Qiu, Q., Qi, W., Liu, X., Chen, X., Cui, X., Li, S., et al. (2019). The Arabidopsis H3K27me3 demethylase JUMONJI 13 is a temperature and photoperiod dependent flowering repressor. *Nat. Commun.* *10*, 1303. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09310-x>.
- Zhou, Y., Romero-Campero, F.J., Gómez-Zambrano, Á., Turck, F., and Calonje, M. (2017a). H2A monoubiquitination in *Arabidopsis thaliana* is generally independent of LHP1 and PRC2 activity. *Genome Biol.* *18*, 69. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1197-z>.
- Zhou, Y., Tergemina, E., Cui, H., Förderer, A., Hartwig, B., Velikkakam James, G., Schneeberger, K., and Turck, F. (2017b). Ctf4-related protein recruits LHP1-PRC2 to maintain H3K27me3 levels in dividing cells in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, 4833–4838. <https://doi.org/10.1073/pnas.1620955114>.
- Zhou, Y., Wang, Y., Krause, K., Yang, T., Dongus, J.A., Zhang, Y., and Turck, F. (2018). Telobox motifs recruit CLF/SWN-PRC2 for H3K27me3 deposition via TRB factors in *Arabidopsis*. *Nat. Genet.* *50*, 638–644. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0109-9>.