



HAL
open science

Rôle des modifications chromatinienne dans la variation phénotypique chez les plantes

Antoine Martin

► **To cite this version:**

Antoine Martin. Rôle des modifications chromatinienne dans la variation phénotypique chez les plantes. Biologie végétale. 2017. tel-02789840

HAL Id: tel-02789840

<https://hal.inrae.fr/tel-02789840>

Submitted on 5 Jun 2020

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License



Dossier présenté pour l'obtention de l'HDR

Antoine Martin

Laboratoire Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes

Chargé de recherche dans l'équipe Intégration des signalisations nutritionnelles



Table des matières

1. Curriculum vitae	5
2. Travaux de recherche	10
2.1. Introduction: la chromatine comme contrôle de l'expression du génome.....	10
2.2. Identification d'une épimutation à l'origine du déterminisme du sexe chez le melon	11
2.2.1. <i>Contexte: le déterminisme sexuel chez les plantes</i>	11
2.2.2. <i>Résultats</i>	11
2.3. Etablissement des épimutations et de leur contribution à la variation phénotypique héritable chez Arabidopsis.....	12
2.3.1. <i>Contexte: variation phénotypique et variants épigénétiques</i>	12
2.3.2. <i>Résultats</i>	14
2.4. Contribution de la dynamique chromatinienne dans la réponse aux variations nutritionnelles chez Arabidopsis.....	18
2.4.1. <i>Contexte: dynamique chromatinienne et réponse au stress</i>	18
2.4.2. <i>Résultats</i>	20
3. Projet de recherche	26
3.1. Une approche intégrative de la régulation de l'adaptation à la carence en nitrate.....	27
3.1.1. <i>Signalisation de la carence en NO₃⁻ et dé-répression chromatinienne</i>	27
3.1.2. <i>Analyse type cellulaire-spécifique de la dynamique H3K27me3 aux locus NRT2.1, NRT2.4 et NRT2.5 en réponse à une carence en NO₃⁻</i>	29
3.1.3. <i>Analyse épigénomique de la carence en NO₃⁻</i>	29
3.1.4. <i>Intégration des contrôles transcriptionnels (chromatiniens) et post-transcriptionnels (stabilité des messagers) dans la réponse au nitrate</i>	30
3.2. Une approche de biologie des systèmes pour comprendre l'effet du changement climatique sur la nutrition minérale des plantes.	33
3.3. Vers une nouvelle méthode d'étude des interactions entre séquences régulatrices et facteurs de transcription.....	36
4. Intégration dans le paysage local, moyens financiers et humains, et collaborations stratégiques	39
5. Conclusion	40
6. Références	41

1. Curriculum vitae

Antoine MARTIN

Chargé de recherche (CR1) au CNRS

Né le 25-09-1978 à Poitiers, nationalité française

Marié, 3 enfants

Laboratoire Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes (BPMP), Campus INRA /
SupAgro 2 place Pierre Viala 34060 Montpellier Cedex 1.

04.99.61.26.12

antoine.martin@supagro.fr

DIPLOMES

2005 Doctorat en biologie, Université Paris-Sud Orsay (France).

2002 DEA en Adaptation des plantes aux contraintes environnementales, Université Paris-Sud Orsay (France).

2001 Maîtrise de Biologie Cellulaire et Physiologie, Université d'Orléans (France).

2000 Licence de Biologie Cellulaire et Physiologie, Université de Tours (France).

1999 DEUG Sciences de la Vie, Université d'Orléans (France).

PARCOURS

2014-présent CR1 CNRS, Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, Montpellier.
Equipe Intégration des signalisations nutritionnelles, dirigée par Alain Gojon.

Projet de recherche: Dynamique chromatinienne en réponse aux variations nutritionnelles chez Arabidopsis.

2013-2014 CR2 CNRS, Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, Montpellier.
Equipe Intégration des signalisations nutritionnelles, dirigée par Alain Gojon.

Projet de recherche: Dynamique chromatinienne en réponse aux variations nutritionnelles chez Arabidopsis.

2010-2012 CR2 CNRS, Institut de Biologie de l'ENS, Paris. Equipe Epigénétique et épigénomique chez Arabidopsis, dirigée par Vincent Colot.

Projet de recherche: Etablissement et conséquences phénotypiques des changements épigénétiques héréditaires chez Arabidopsis.

2007-2010 Chercheur post-doctoral, Unité de Recherche en Génomique Végétale, Evry. Equipe Génomique fonctionnelle des plantes cultivées, dirigée par Abdel Bendahmane.

Projet de recherche: Etude des bases génétiques et épigénétiques du déterminisme du sexe chez les plantes.

2005-2007 Chercheur post-doctoral, Institut de Biologie Moléculaire de Barcelone (Espagne). Equipe Signalisation à longue distance, dirigée par Paula Suarez-Lopez.

Projet de recherche: Signalisation des miRNAs à longue distance chez les plantes.

2002 - 2005: Etudiant en thèse, Institut Jean-Pierre Bourgin, Versailles. Equipe Gestion de l'azote et productivité végétale, dirigée par Bertrand Hirel.

Projet de recherche: Bases génétiques de l'efficacité d'utilisation de l'azote chez les plantes.

ENSEIGNEMENT

Module "Epigénétique" du Master 2 Biologie Fonctionnelle des Plantes de l'Université de Montpellier (7h30).

Module "Grandes fonctions métaboliques et nutrition minérale" du Master 1 Biologie des Plantes de l'Université de Montpellier (3h).

Ecole thématique MISTRAL (Montpellier International School on ion and water Transport in plants), BPMP (1h).

IMPLICATION DANS DES PROJETS ET RESEAUX SCIENTIFIQUES

Projet ANR IMANA (2014-2018, WP Leader): Identification of key Molecular switches for the Adaptation to Nitrogen Availability in plants (Coordinateur A. Krapp).

Projet INRA BAP ACSES (2014, Coordinateur): Analyse Cellule-Spécifique de l'Epigénome en réponse au Stress.

Projet ANR Bioadapt Memostress (2012): Testing the stability and adaptive potential of stress-induced epigenetic variation (Coordinateur V. Colot).

Réseau European Science Foundation EpiCOL (2010): Ecological and evolutionary plant epigenetics (Coordinateur O. Bossdorf).

Projet ANR blanc Epimobile (2010): Assessing the impact of DNA methylation loss on genome stability: a quantitative genetics perspective (Coordinateur V. Colot).

ENCADREMENT

Doctorant

Fanny Bellegarde (2014-2017), "Rôle de la dynamique chromatinienne dans la signalisation nutritionnelle chez Arabidopsis". Co-encadrement avec Alain Gojon.

Master 2

Léo Herbert (2017, Université de Montpellier)
Thomas Gayraud (2014, Université de Montpellier)
Juliette Chantrenne (2015, école d'agronomie de Nancy ENSAIA)

Master 1

Amel Maghiaoui (2016, Université de Montpellier)
Marianne Rougier (2015, Université de Montpellier)
Fanny Bellegarde (2013, Université de Montpellier)

Licence

Tom Pioffret (2014, Université de Montpellier)
Antoine Hocher (2012, ENS)

CONTRIBUTION AU FONCTIONNEMENT DE COLLECTIFS DE RECHERCHE

Membre de la section 23 du comité national du CNRS depuis septembre 2016.

Membre du comité d'organisation de la conférence EMBO "The Nitrogen Nutrition of Plants 2016".

Membre du conseil de service de l'unité BPMP depuis 2015.

Membre du jury de concours 2011 de l'école doctorale Sciences du végétal, Université Paris Sud.

EXPERTISE

Activité de relecture pour les journaux PLoS One, Genome Biology, Plant Biotechnology Journal, BMC Plant Biology.

Expertises pour la FWF (Autriche), DFG (Allemagne), l'INRA et le labex Saclay Plant Science.

Participation à 4 comités de thèse:

Nicolas Tissot (2014-2016, BPMP, Montpellier)
Mathilde Etcheverry (2012, IBENS, Paris)
John Eleblu (2011, URGV, Evry)
Farahj Izhaq (2011, URGV, Evry)

Participation à 1 jury de thèse :

Nathalie Berger (2012): "*Contribution à l'analyse génétique et moléculaire du développement de la graine d'Arabidopsis thaliana: étude de la régulation de l'expression du gène LEAFY COTYLEDON 2*"(examineur).

INDICES BIBLIOGRAPHIQUES

12 publications (+1 actuellement en revue)

Facteur d'impact moyen: 13,7

Nombre total de citations: 736

Nombre moyen de citations: 66,91

Indice h: 9

COMMUNICATIONS ORALES A DES SEMINAIRES ET CONFERENCES

European Workshop in Plant Chromatin. Upsalla, Suède. Mai 2015.

International Conference on Arabidopsis Research. Paris, Juillet 2015.

UMR Diversité Adaptation et DEveloppement des plantes (DIADE), Montpellier: Epigenetic control of transposable elements and consequences on gene expression in Arabidopsis, Juin 2012.

Plant and Animal Genomes International Conference, San Diego, USA: Epigenetic basis of sex determination in melon, Janvier 2010.

MOB'ile de France, Paris: An epigenetic mutation leads to sex determination in melon, Novembre 2009.

16th FESPB Congress at Tampere, Finland: Epigenetic control of sex determination in plants, Août 2008.

PUBLICATIONS

***corresponding author**

Encadrement

Tissot N., Boucherez J., **Bellegarde F.**, Maghiaoui A., Marcellin R., **Martin A.**, Gaymard F., Briat J. F., Dubos C. 2016 Integration of the responses to iron availability fluctuations in plants by ILR3/bHLH105. *Submitted to The Embo Journal*.

12. Bellegarde F., Gojon A., **Martin A.*** 2016 Signals and actors of the transcriptional regulation of root responses by local and systemic N signaling in *Arabidopsis thaliana*. ***J Ex Bot, in press.***

11. Gilly A, Etcheverry M, Madoui MA, Guy J, Quadrana L, Alberti A, **Martin A**, Heitkam T, Engelen S, Labadie K, Le Pen J, Wincker P, Colot V, Aury J. M. 2014. TE-Tracker: systematic identification of transposition events through whole-genome resequencing. ***BMC bioinformatics*** 15: 377

10. Mari-Ordonez A, Marchais A, Etcheverry M, **Martin A**, Colot V, Voinnet O. 2013. Reconstructing de novo silencing of an active plant retrotransposon. ***Nat Genet*** 45: 1029-39

9. Colome-Tatche M, Cortijo S, Wardenaar R, Morgado L, Lahouze B, Sarazin A, Etcheverry M, **Martin A**, Feng S, Duvernois-Berthet E, Labadie K, Wincker P, Jacobsen SE, Jansen RC, Colot V, Johannes F. 2012. Features of the Arabidopsis recombination landscape resulting from the combined loss of sequence variation and DNA methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 16240-5
8. **Martin A**, Bendahmane A. 2010. A blessing in disguise: Transposable elements are more than parasites. *Epigenetics* 5: 378-80
7. **Martin A**, Troadec C, Boualem A, Rajab M, Fernandez R, Morin H, Pitrat M, Dogimont C, Bendahmane A. 2009. A transposon-induced epigenetic change leads to sex determination in melon. *Nature* 461: 1135-8
6. **Martin A**, Adam H, Diaz-Mendoza M, Zurczak M, Gonzalez-Schain ND, Suarez-Lopez P. 2009. Graft-transmissible induction of potato tuberization by the microRNA miR172. *Development* 136: 2873-81
5. Coque M, **Martin A**, Veyrieras JB, Hirel B, Gallais A. 2008. Genetic variation for N-remobilization and postsilking N-uptake in a set of maize recombinant inbred lines. 3. QTL detection and coincidences. *Theor Appl Genet* 117: 729-47
4. Boualem A, Fergany M, Fernandez R, Troadec C, **Martin A**, Morin H, Sari MA, Collin F, Flowers JM, Pitrat M, Purugganan MD, Dogimont C, Bendahmane A. 2008. A conserved mutation in an ethylene biosynthesis enzyme leads to andromonoecy in melons. *Science* 321: 836-8
3. **Martin A**, Lee J, Kichey T, Gerentes D, Zivy M, Tatout C, Dubois F, Balliau T, Valot B, Davanture M, Terce-Laforgue T, Quillere I, Coque M, Gallais A, Gonzalez-Moro MB, Bethencourt L, Habash DZ, Lea PJ, Charcosset A, Perez P, Murigneux A, Sakakibara H, Edwards KJ, Hirel B. 2006. Two cytosolic glutamine synthetase isoforms of maize are specifically involved in the control of grain production. *Plant Cell* 18: 3252-74
2. **Martin A**, Belastegui-Macadam X, Quillere I, Floriot M, Valadier MH, Pommel B, Andrieu B, Donnison I, Hirel B. 2005. Nitrogen management and senescence in two maize hybrids differing in the persistence of leaf greenness: agronomic, physiological and molecular aspects. *New Phytol* 167: 483-92
1. Hirel B, **Martin A**, Terce-Laforgue T, Gonzalez-Moro M-B, Estavillo J-M. 2005. Physiology of maize I: A comprehensive and integrated view of nitrogen metabolism in a C4 plant. *Physiologia Plantarum* 124: 167-77

2. Travaux de recherche

Au cours de mon parcours, j'ai effectué une thèse à l'IJPB de Versailles sur les bases génétiques et physiologiques de l'efficacité d'utilisation de l'azote chez le maïs. Ce travail de génétique moléculaire et de physiologie a montré l'importance d'une isoforme de la glutamine synthétase cytosolique dans le développement et la qualité du grain (Martin *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2006). J'ai ensuite réalisé un premier séjour de post-doctorat à l'IBMB de Barcelone, où j'ai montré le rôle d'un microARN et sa conservation dans la reproduction végétative chez les plantes (Martin *et al.*, 2009a). Je ne détaillerai pas dans ce rapport les travaux menés dans le cadre de ma thèse à l'IJPB et de mon post-doctorat à l'IBMB de Barcelone, malgré l'importance que je leur accorde dans mon parcours. Je vais décrire ci-dessous mes travaux de recherche à partir du post-doctorat réalisé sur la régulation épigénétique d'un gène du déterminisme sexuel chez les plantes. Ce projet est le point de départ des travaux de recherche qui ont suivi, et que je mène actuellement.

2.1. Introduction: la chromatine comme contrôle de l'expression du génome.

Chez les eucaryotes, l'activité du génome est contrôlée par la chromatine, structure qui associe l'ADN aux protéines histones. Longtemps vue uniquement comme un système de compaction de l'ADN, la chromatine est maintenant considérée comme une structure dynamique qui affecte toutes les transactions liées à l'ADN dans le noyau: réplication, transcription, réparation, recombinaison, etc. L'unité de base de la chromatine est le nucléosome, composé d'un octamère de quatre protéines histones H2A, H2B, H3 et H4, autour duquel s'enroule environ 150 paires de base d'ADN. L'activité du génome est contrôlée par une multitude de modifications chromatinienne, dont la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones, le remplacement d'histones par des variants d'histones (Bell *et al.*, 2011). La méthylation de l'ADN chez les plantes se retrouve sur les cytosines, et intervient sur les sites CG, CHG et CHH (où H=A, T ou C). Les modifications post-traductionnelles des histones comprennent notamment l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitination, ou la phosphorylation d'acides aminés localisés dans la partie N-terminale des histones. La méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones peuvent influencer directement la structure de la chromatine par un effet stérique, ou offrir un site de reconnaissance pour des protéines effectrices. Chez *Arabidopsis*, des analyses intégratives de la distribution des principales marques chromatinienne ont révélé que 4 états chromatinien, correspondant à la combinaison de plusieurs marques chromatinienne, couvraient l'ensemble du génome (Roudier *et al.*, 2011). Un état chromatinien impliquant la méthylation de l'ADN et la diméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me₂) est associé à la répression transcriptionnelle des éléments transposables et des séquences répétées du génome. Les gènes réprimés sont associés à un état chromatinien faisant intervenir H3K27me₃. A l'opposé, les gènes exprimés sont associés à un état chromatinien impliquant l'ubiquitination d'H2B (H2Bub), H3K4me₃ et H3K36me₃. Un quatrième état chromatinien n'est pas enrichi en marques chromatinienne connues, et cible principalement les régions intergéniques.

L'ensemble de ces variations chromatinienne, ou épigénome, contribue fortement à contrôler l'expression du génome, et a une importance particulière dans le développement et l'adaptation des plantes. **Mes travaux de recherche ont constitué à caractériser, à travers différents modèles, l'établissement, le rôle et la transmission de modifications chromatinienne dans la variation phénotypique des plantes.**

2.2. Identification d'une épimutation à l'origine du déterminisme du sexe chez le melon

2.2.1. Contexte: le déterminisme sexuel chez les plantes

Si la majorité des plantes sont totalement hermaphrodites, une évolution majeure des angiospermes entraîne le développement de plantes sexuées, majoritairement monoïques ou dioïques (Zhang *et al.*, 2014). Le déterminisme du sexe chez les plantes consiste en l'arrêt de développement précoce de l'un des organes sexuels (étamines ou carpelles), pour aboutir à une fleur unisexuée (Tanurdzic and Banks, 2004). Les cucurbitacées, dont fait partie le melon, sont un des principaux modèles d'études du déterminisme sexuel chez les plantes. Chez le melon, 2 gènes contrôlent le déterminisme sexuel des individus, et leur combinaison allélique entraîne la présence de plantes mâles, femelles, ou hermaphrodites. A mon arrivée dans l'équipe d'Abdel Bendahmane à l'URGV d'Evry, l'équipe terminait le clonage positionnel de la mutation naturelle *Gynoecious*, responsable de l'apparition d'individus femelles.

2.2.2. Résultats

De manière surprenante, le locus cloné ne présentait aucune variation nucléotidique de type SNP, mais l'insertion d'un élément transposable à proximité du gène le plus proche. Le fait que l'insertion d'un élément transposable, dans une région intergénique, soit responsable du déterminisme du sexe, nous a suggéré qu'un mécanisme épigénétique y était associé. Les éléments transposables sont en effet soumis dans le génome à une régulation épigénétique stricte afin de limiter leur mobilité. Ce contrôle se fait principalement par la méthylation de l'ADN, et également par la modification des histones et les petits ARNs (Fultz *et al.*, 2015). Le gène situé en amont de l'élément transposable code un facteur de transcription de la famille WIP et a été nommé *CmWIP1*. Les études que nous avons menées ont montré que l'élément transposable inséré en 3' du gène *CmWIP1* était effectivement soumis à un contrôle *via* la méthylation de l'ADN. La méthylation de l'ADN ciblée sur cet élément transposable diffuse au locus, spécifiquement sur une région du promoteur de *CmWIP1*, ce qui a pour conséquence d'éteindre la transcription de ce gène (Fig. 1) (Martin and Bendahmane, 2010; Martin *et al.*, 2009b). Nous avons pu montrer à travers différentes approches que la méthylation différentielle sur ce facteur de transcription était la cause finale du déterminisme du sexe. Enfin des études de génétique inverse et de génomique fonctionnelle ont confirmé la fonction de *CmWIP1* dans le déterminisme sexuel chez le melon, ce facteur de transcription ayant pour rôle de bloquer le développement des carpelles dans les fleurs mâles.

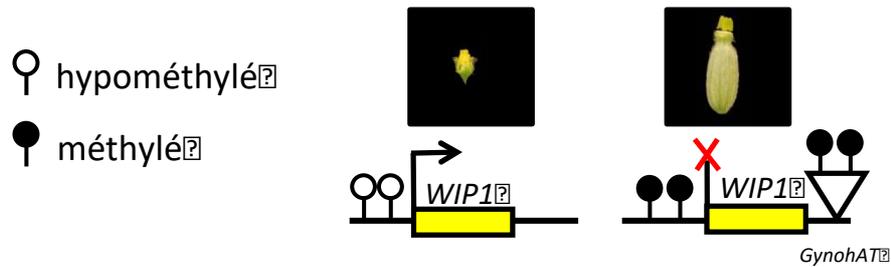


Figure 1: Représentation schématique de l'impact de l'insertion d'un élément transposable de la famille HAT (nommé GynohAT) à proximité du gène CmWIP1. La méthylation de l'ADN ciblée sur GynohAT diffuse sur le promoteur de CmWIP1, entraînant son extinction transcriptionnelle, et le développement de fleurs femelles.

Les résultats issus de ce post-doctorat ont menés à la publication de 3 articles :

Boualem A, Fergany M, Fernandez R, Troadec C, Martin A, Morin H, Sari MA, Collin F, Flowers JM, Pitrat M, Purugganan MD, Dogimont C, Bendahmane A. 2008. A conserved mutation in an ethylene biosynthesis enzyme leads to andromonoecy in melons. *Science* **321, 836-838.**

Martin A, Bendahmane A. 2010. A blessing in disguise: Transposable elements are more than parasites. *Epigenetics* **5, 378-380.**

Martin A, Troadec C, Boualem A, Rajab M, Fernandez R, Morin H, Pitrat M, Dogimont C, Bendahmane A. 2009. A transposon-induced epigenetic change leads to sex determination in melon. *Nature* **461, 1135-1138.**

Outre son importance pour le déterminisme du sexe, ce travail montre un intérêt particulier pour l'analyse des relations entre les éléments transposables et l'expression des gènes voisins. Nous avons montré d'une part que des changements épigénétiques, comme la méthylation de l'ADN, peuvent être liés à la transmission de caractères stables chez les plantes. Actuellement, ceci est une question fondamentale dans la transmission des caractères chez les plantes mais aussi chez les animaux : les épiallèles peuvent-elles être à la base d'une variation phénotypique transmissible d'une génération à une autre ? D'autre part, nous montrons un exemple fort où l'insertion d'éléments transposables dans des régions géniques a un impact conséquent sur l'expression des gènes environnants, et permet l'adaptation et l'évolution d'une espèce.

Afin de répondre à ces questions, il est indispensable d'utiliser une espèce modèle en génétique et en génomique. J'ai donc proposé au CNRS de développer ce projet sur *Arabidopsis*, dans le laboratoire de Vincent Colot, expert en épigénomique et dans l'étude des mécanismes épigénétiques chez les plantes.

2.3. Etablissement des épimutations et de leur contribution à la variation phénotypique héritable chez *Arabidopsis*

2.3.1. Contexte: variation phénotypique et variants épigénétiques

Très peu d'épimutations ont été identifiées à ce jour dans les populations naturelles (Cubas *et al.*, 1999; Manning *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2009b; Miura *et al.*, 2009; Silveira *et al.*, 2013).

Ceci peut s'expliquer en partie du fait que dès lors que les épimutations sont transmises selon les lois de Mendel, leurs effets sur la variation phénotypique héritable ne se distinguent *a priori* en aucune façon de ceux produits par les mutations nucléotidiques. Vouloir déterminer la part respective des uns et des autres est de ce fait difficile dans les populations naturelles ou expérimentales présentant simultanément de très nombreux polymorphismes nucléotidiques et épigénétiques (Johannes *et al.*, 2008). C'est pourquoi, afin de parvenir à une première évaluation de l'impact potentiel des variations épigénétiques comme source directe de variation phénotypique héritable, une population de lignées recombinantes épigénétiques a été établie chez *Arabidopsis*. Cette population a été développée dans l'équipe de Vincent Colot par croisement entre un parent sauvage et un parent de même origine mais présentant une mutation dans le gène *DDM1*, et par conséquent une réduction de près de 70% de la méthylation de l'ADN dans le génome. Plus de 500 lignées de génotype *DDM1/DDM1* ont été sélectionné en F2 pour servir à l'obtention de ces "epiRILs" (Fig. 2 ; (Johannes *et al.*, 2009)).

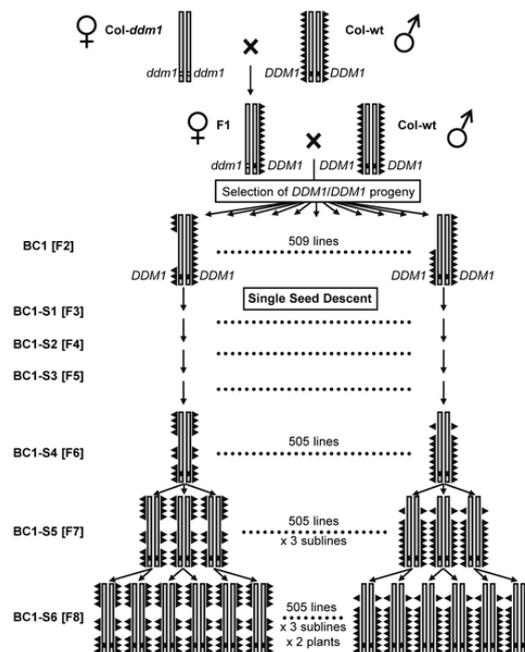


Figure 2. Génération d'une population d'epiRIL à partir d'un croisement entre *Col0-wt* et *Col0-ddm1*. Les epiRILs sont toutes de génotype *Col0-wt* (Johannes *et al.*, 2009).

Cette population d'epiRIL permet donc d'une part de tester la stabilité transgénérationnelle d'un grand nombre de variants épigénétiques le long du génome, et d'autre part de mesurer leur impact phénotypique propre. Les résultats obtenus à ce jour ont confirmé la validité de cette approche, puisqu'ils ont montré une grande stabilité (sur au moins 8 générations) de nombreux variants épigénétiques, ainsi qu'une variation phénotypique héritable pour plusieurs caractères complexes tels que la floraison et la hauteur des individus à maturité (Johannes *et al.*, 2009). Néanmoins, en raison notamment de la mobilisation inévitable de certains éléments transposables suite à leur déméthylation, la variation nucléotidique doit

être prise en compte. Afin d'étudier et d'exploiter au mieux cette population d'epiRILs, plusieurs projets à large échelle ont été entrepris. D'une part, l'épigénotypage (méthylation de l'ADN) systématique de plus de 100 lignées ainsi que des lignées parentales a été réalisé par MeDIP-chip dans le laboratoire de Vincent Colot. De plus, à mon arrivée dans l'équipe de Vincent Colot, nous avons initié le séquençage complet du génome de ces 100 lignées et des lignées parentales, afin de pouvoir analyser dans cette population la dynamique des éléments mobiles en relation avec le contrôle épigénétique qui leur est soumis.

Le projet de recherche que j'ai mené à l'IBENS a suivi 2 objectifs principaux:

(i) En s'appuyant sur les projets de séquençage massif des epiRILs, étudier la dynamique des épimutations. La perturbation du contrôle épigénétique dans les epiRILs entraîne inévitablement une réactivation transcriptionnelle de certains éléments transposables, et, pour un certain nombre, une dynamique de transposition. Ces nouvelles insertions d'éléments mobiles permettent d'étudier les différentes étapes de l'établissement d'épimutations: mobilité des éléments transposables réactivés, établissement d'un contrôle épigénétique sur ces nouvelles insertions, étude de l'influence du contrôle épigénétique de ces nouvelles insertions d'éléments transposables sur l'expression des gènes avoisinants.

(ii) Etudier le potentiel adaptatif des épimutations induites par le stress environnemental. Un nombre croissant de données indique que les marques épigénétiques pourraient être sensibles aux variations de l'environnement et conférer un potentiel d'adaptation aux plantes dans des milieux changeants. Cependant, l'étude de populations naturelles est rendue difficile par les variations environnementales non contrôlées et par des modèles végétaux peu caractérisés. Nous avons donc entrepris d'analyser, grâce à des systèmes de phénotypage à haut-débit d'une grande précision, l'influence de l'environnement sur la mise en place des variations épigénétiques et leur potentiel adaptatif chez *Arabidopsis*.

2.3.2. Résultats

Analyse de la transposition dans les epiRILs

La population d'epiRILs a été développée dans le but de maximiser les variations chromatiennes, tout en minimisant les variations nucléotidiques au sein des différents individus. Cependant, la réactivation transcriptionnelle des éléments transposable suite à la perte de méthylation de l'ADN entraîne inévitablement la transposition de certains d'entre eux, et donc une certaine variation nucléotidique. Pour autant, la mobilité de certains éléments transposables dans la population d'epiRILs est paradoxalement une caractéristique toute aussi attractive de cette ressource. En effet, ceci permettra de suivre de manière originale les différentes étapes de la mise en place d'épiallèles : l'insertion nouvelle d'un élément transposable, la mise en place du contrôle épigénétique sur ces nouvelles insertions, et l'influence éventuelle sur l'expression des gènes avoisinants. Cependant, ceci implique d'avoir accès à l'ensemble des nouvelles insertions d'éléments transposables dans les epiRILs. Nous avons donc pour cela entrepris d'effectuer le séquençage complet du génome d'une partie des epiRILs. A mon arrivée au laboratoire "Epigénétique et

épigénomique chez *Arabidopsis*", ce projet était soutenu par un financement ANR Blanc "Epimobile", en collaboration avec l'équipe de Patrick Wincker au Génoscope. Un sous-ensemble de 105 lignées a été sélectionné pour le séquençage de leur génome. Ces 105 lignées ont été choisies dans la population car le laboratoire avait également réalisé récemment l'épigénotypage (méthylation de l'ADN sur l'ensemble du génome par MeDIP-chip) de ces 105 lignées. La séquence du génome de ces lignées a été obtenue par re-séquençage (séquençage massif *Illumina* puis alignement sur la référence Col-0), en utilisant un protocole mate-pairs, permettant d'étudier plus facilement à terme les variations structurales dans le génome. Afin d'analyser de manière exhaustive la dynamique du génome (transposition d'éléments transposables, translocation, indels, etc.) des epiRILs, un programme bioinformatique nouveau a été développé en collaboration avec l'équipe de Jean-Marc Aury au Génoscope. A travers ce programme, nommé "*TE-Tracker*", les données de séquences mate-pairs issues du génome des epiRILs ont révélé que la perte de méthylation de l'ADN aboutissait à une transposition importante des éléments mobiles du génome d'*Arabidopsis*, mais uniquement pour un faible nombre. En effet, malgré la réactivation transcriptionnelle massive observée après les pertes de méthylation de l'ADN chez les epiRILs, seulement une dizaine d'éléments transposables sont capable de transposer, même parmi ceux qui présentent un potentiel codant intègre (sans accumulation de mutations dans leur séquence codante). L'exemple le plus parlant est celui de 2 éléments de la famille *COPIA93*, appelés *Evadé (EVD)* et *Attrapé*. Suite à la perte de méthylation de l'ADN, *EVD* est très actif, représentant jusqu'à 50% de l'ensemble des nouvelles insertions dans la population. A l'inverse, *Attrapé*, malgré la perte de méthylation de l'ADN, ne présente pas de nouvelles insertions. Ces 2 éléments diffèrent uniquement de quelques variations nucléotidiques, laissant penser que d'autres contrôles chromatinien non affectés dans le parent *ddm1* peuvent être responsables du contrôle d'*Attrapé*. Il est intéressant de noter qu'*EVD* est situé dans une zone euchromatique, alors qu'*Attrapé* est situé dans une zone hétérochromatique. La validité du programme *TE-Tracker* a été évaluée en testant la présence de certaines nouvelles insertions par PCR. Toutes les insertions analysées ont confirmé les résultats de *TE-Tracker* (Gilly *et al.*, 2014).

Etude de l'établissement et de l'influence du contrôle épigénétique des nouvelles insertions d'éléments transposables sur les gènes avoisinants

L'identification des nouvelles insertions d'éléments transposables dans le génome des epiRILs offre la possibilité unique de suivre la mise en place du contrôle épigénétique des séquences répétées à travers les générations. Pour cela, nous avons développé plusieurs générations successives pour quelques lignées d'epiRILs, sélectionnées sur la base des données de transposition obtenues précédemment. Nous avons ensuite étudié le profil d'expression, de méthylation de l'ADN et d'augmentation du nombre de copies de certains éléments transposables, en particulier *EVD*. Nos résultats confirment qu'*EVD* est capable de produire un burst de retrotransposition dans le génome d'*Arabidopsis*. Ces résultats montrent également que le silencing d'*EVD* dans le génome ne dépend pas du nombre de générations, mais du nombre de copies dans le génome, estimé à 40. Nous avons ensuite étudié l'influence des nouvelles insertions et de la mise en place du contrôle épigénétique de

*nov*o sur l'expression des gènes à proximité. L'epiRIL 454, choisie pour cette analyse, présente à la génération 8 (F8) 2 insertions homozygotes d'EVD, dans la séquence du gène *AT1G68420* et en amont du gène *AT5G25550*. Ces 2 insertions augmentent le niveau de transcrits des 2 gènes lorsqu'EVD n'est pas méthylé. A l'inverse, la mise en place de la méthylation de l'ADN sur EVD (sur des plantes de générations F9 ou F15) entraîne une diminution de l'expression de ces gènes (Fig. 3).

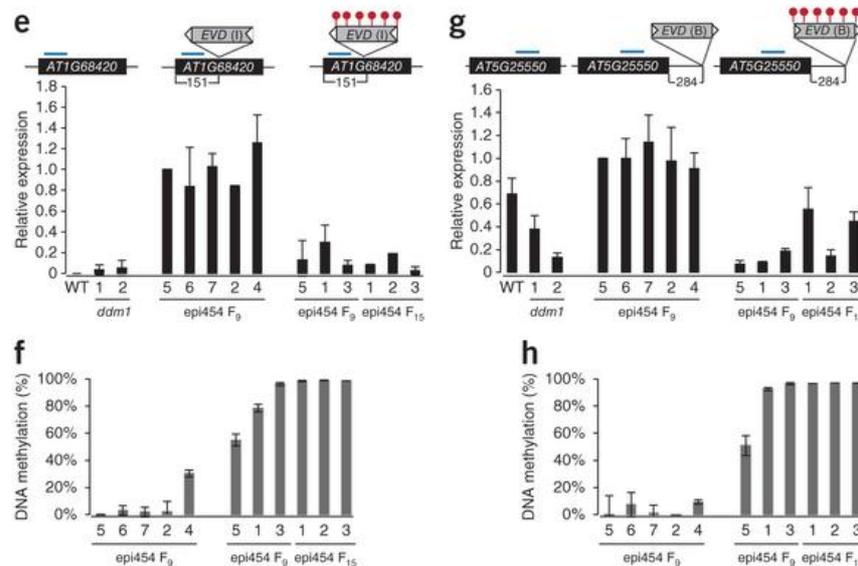


Figure 3: Niveau d'expression des gènes *AT1G68420* (e) chez une lignée sauvage (WT), *ddm1*, et chez l'epiRIL454 (F9 et F15) présentant une insertion d'EVD en état non-méthylée ou méthylée (f). L'expression (g) et la méthylation de l'ADN (h) ont été déterminées de la même manière pour le gène *AT5G25550*, présentant une insertion d'EVD en 3'. D'après Mari-Ordonez et al., 2013.

Ces résultats illustrent les conséquences génétiques et épigénétiques de la mobilité des éléments transposables, et démontrent de manière originale l'importance du contrôle épigénétique des éléments transposables sur l'expression des gènes, qui peut être à l'origine de variations phénotypiques chez les plantes. Ces résultats, en complément à l'analyse moléculaire détaillée de l'établissement du contrôle épigénétique sur EVD réalisée dans le laboratoire d'Olivier Voinnet à l'ETH de Zurich, font partie d'un article publié en 2013 dans *Nature Genetics*:

Mari-Ordonez A, Marchais A, Etcheverry M, Martin A, Colot V, Voinnet O. 2013. Reconstructing de novo silencing of an active plant retrotransposon. Nat Genet 45, 1029-1039.

Analyse du potentiel épiallélique chez *Arabidopsis*

Les résultats précédents démontrent l'importance que peut avoir le contrôle épigénétique des éléments transposables sur l'expression des gènes. Cependant, nous avons observé grâce aux epiRILs que le contrôle épigénétique *de novo* des éléments transposables n'influençait pas systématiquement l'expression de gènes voisins. Il semble donc que le contexte génomique (proximité de l'insertion, activité de l'élément transposable, état chromatinien, etc.) soit déterminant. Afin d'analyser le potentiel épiallélique du génome

d'Arabidopsis, c'est à dire le réservoir de gènes dont l'expression peut être influencée par la perturbation du contrôle épigénétique des séquences répétées à proximité, nous avons réalisé par RNA-seq et comparé les transcriptomes de lignées WT, *ddm1*, et de plusieurs lignées epiRILs. L'analyse de ces transcriptomes montre dans un premier temps que la majorité des variations d'expression dues aux changements de méthylation de l'ADN s'opère en *cis*. Différents modèles d'épimutations peuvent ressortir de cette analyse, révélant une complexité plus grande que celle observée pour les épiallèles identifiées jusqu'alors chez les plantes (Fig. 4). Bien que toutes les épimutations soient dues à la perte du contrôle épigénétique d'une séquence répétée, ces observations suggèrent que de multiples déterminants moléculaires sont à la base des épimutations dans le génome.

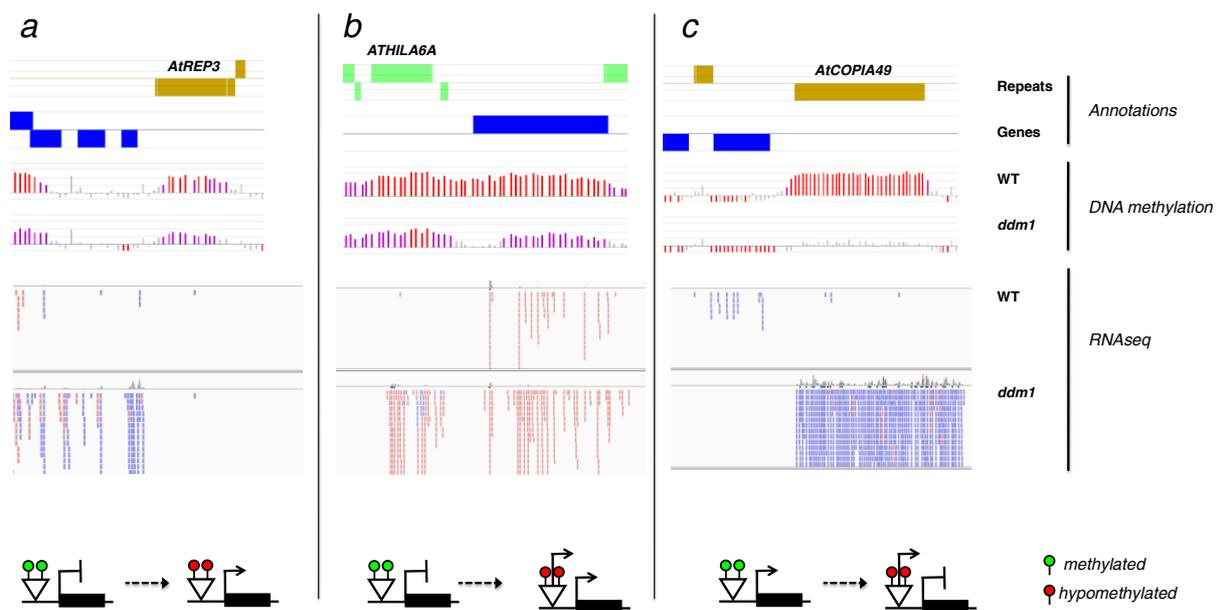


Figure 4: À la suite d'une perte de méthylation de l'ADN, plusieurs modèles d'épimutations peuvent être observés dans le génome. **a.** Une perte partielle de méthylation d'ADN sur une séquence répétée entraîne la réactivation transcriptionnelle d'un gène voisin. **b.** La perte de méthylation de l'ADN sur un élément répété entraîne non seulement sa réactivation transcriptionnelle, mais également l'augmentation de l'expression du gène voisin, suggérant la présence d'interférence transcriptionnelle. **c.** La perte de méthylation de l'ADN sur un élément répété entraîne non seulement sa réactivation transcriptionnelle, mais également la diminution de l'expression d'un gène à proximité.

Ces résultats font partie d'une publication dans *PNAS* sur l'analyse des liens entre méthylation de l'ADN, expression du génome et recombinaison:

Colome-Tatche M, Cortijo S, Wardenaar R, Morgado L, Lahouze B, Sarazin A, Etcheverry M, Martin A, Feng S, Duvernois-Berthet E, Labadie K, Wincker P, Jacobsen SE, Jansen RC, Colot V, Johannes F. 2012. Features of the Arabidopsis recombination landscape resulting from the combined loss of sequence variation and DNA methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 16240-16245.

Etude des variations épigénétiques induites par le stress et de leurs conséquences phénotypiques.

Un nombre croissant de données indique que les marques épigénétiques pourraient être sensibles aux variations de l'environnement, et conférer un potentiel d'adaptation aux plantes dans des milieux changeants. Cependant, l'étude de populations naturelles est rendue difficile par les variations environnementales non contrôlées et par des modèles végétaux peu caractérisés. Nous avons donc entrepris d'analyser, grâce à des systèmes de phénotypage à haut-débit d'une grande précision, l'influence de l'environnement sur la mise en place des variations épigénétiques et leur potentiel adaptatif chez *Arabidopsis*. Ce projet est réalisé d'une part en collaboration avec l'équipe d'Olivier Loudet à l'Institut Jean-Pierre Bourgin de Versailles, qui possède *Phenoscope*, un robot de phénotypage permettant de suivre la croissance de plusieurs centaines de plantes sous conditions finement contrôlées. Ce travail a été initié dans le cadre d'un projet ANR Bioadapt accepté en 2012. D'autre part, ce travail fait l'objet d'une collaboration dans le cadre d'un projet européen *EpiCOL*, coordonné par Oliver Bossdorf de l'université de Bern.

Plusieurs générations de 5 accessions d'*Arabidopsis* ont été soumises à un stress hydrique modéré ou à des conditions témoins. A chaque génération, la croissance des plantes sous stress hydrique est mesurée afin d'analyser si le fait d'avoir subi un stress à une génération procure un avantage adaptatif à la génération suivante, en comparaison à des plantes n'ayant pas subi ce stress. L'analyse des données de phénotypage pour la deuxième génération ne montre pas d'avantage sélectif pour les plantes stressées à la première génération en comparaison à des plantes témoins. L'analyse de l'épigénome de ces plantes est actuellement en cours. Suite à ma demande de mobilité au CNRS, Vincent Colot, coordinateur de ce projet, a souhaité mettre un terme à mon implication dans ce projet. Nous pouvons néanmoins noter que des projets similaires ont récemment montré que les épimutations induites par l'environnement (stress osmotique ou carence en phosphate) étaient très ponctuelles, et que leur transmission à travers les générations était extrêmement rare (Secco *et al.*, 2015; Wibowo *et al.*, 2016).

En conclusion, les différentes approches menées sur ce projet, mises en parallèle à la littérature récente, montrent que les conséquences phénotypiques des épimutations sont considérables, mais que leur contribution à la réponse aux contraintes de l'environnement reste relativement anecdotique, principalement du fait de contrôles moléculaires très robustes.

2.4. Contribution de la dynamique chromatinienne dans la réponse aux variations nutritionnelles chez *Arabidopsis*

2.4.1. Contexte: dynamique chromatinienne et réponse au stress

J'ai effectué en octobre 2012, pour des raisons familiales, une mobilité vers le laboratoire BPMP à Montpellier dans l'équipe d'Alain Gojon. Cette équipe s'intéresse aux mécanismes responsables de la réponse adaptative des plantes à leur environnement nutritionnel.

Un nombre croissant d'études indique que de nombreux mécanismes chromatinien sont impliqués dans les réponses aux contraintes environnementales, en facilitant ou instruisant les changements d'expression dans le génome nécessaires à l'adaptation aux stress. Il est important de noter ici qu'on ne parle pas de mécanismes épigénétiques à proprement parler (transmission à travers les générations), mais chromatinien. En particulier, plusieurs études récentes ont montré le rôle de la dynamique chromatinienne dans la régulation du génome en réponse au statut hydro-minéral des plantes. Certaines de ces études montrent l'importance de modifications post-traductionnelles ou de variants d'histones dans la réponse au phosphate, dans l'homéostasie du fer ou dans l'adaptation au stress osmotique (Fan *et al.*, 2014; Sani *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2010). Récemment, l'équipe d'Alain Gojon a identifié à travers un crible génétique un mutant, *hni9* (*high nitrogen insensitive 9*), perturbé dans la régulation transcriptionnelle du gène *NRT2.1*, qui code un transporteur de nitrate racinaire majeur chez *Arabidopsis*. Le mutant *hni9* présente un codon stop prématuré dans la séquence du gène *IWS1*, dont l'homologue chez l'humain et la levure est impliqué dans le complexe lié à l'ARN polymérase II (Pol II). De plus, il a été également montré que des variations en H3K27me3, dépendantes d'*IWS1*, étaient corrélées au changement d'expression du gène *NRT2.1* en réponse aux fortes teneurs en azote (Widiez *et al.*, 2011) (Fig.5).

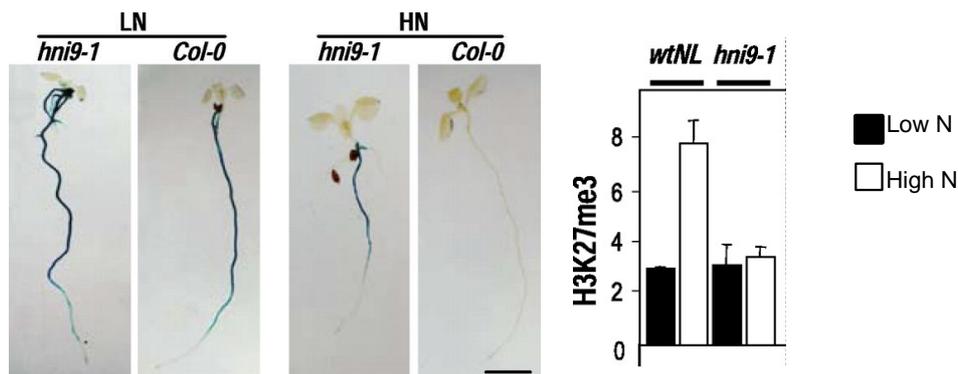


Figure 5: *NRT2.1* est transcriptionnellement réprimé en condition de fortes teneurs en azote, comme l'indique les colorations histochimiques issues d'un rapporteur transcriptionnel *PNRT2.1:GUS*. Cette répression est absente dans un mutant *hni9-1*. En parallèle à cette répression transcriptionnelle, une dynamique H3K27me3 HNI9-dépendante est observée au locus *NRT2.1*. D'après Widiez *et al.* 2011.

H3K27me3 est une marque chromatinienne associée aux gènes transcriptionnellement inactifs dans le génome (Roudier *et al.*, 2011). Cette marque chromatinienne répressive est établie par le complexe protéique Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2). De très nombreuses études, menées chez les animaux et chez les plantes, ont montré que PRC2 et H3K27me3 avaient pour rôle de coordonner les programmes d'expression génomiques afin de contrôler l'identité cellulaire et ainsi les profils de développement (Mozgova and Hennig, 2015; Schwartz and Pirrotta, 2007). A l'inverse, très peu d'études ont révélé un rôle pour PRC2 et H3K27me3 dans la réponse aux contraintes environnementales. Ces résultats sur *NRT2.1* ont donc suggéré de manière originale chez les plantes une importance des mécanismes de dynamique chromatinienne liée à H3K27me3 dans la réponse aux variations

nutritionnelles. A la suite de ces observations, nous avons donc cherché à comprendre le rôle de ces marques chromatiniennes répressives dans la régulation de la réponse aux variations en azote, et plus généralement le rôle de la dynamique chromatinienne dans l'adaptation aux variations nutritionnelles chez *Arabidopsis*.

Le projet de recherche mené sur cette thématique à BPMP a suivi plusieurs objectifs:

- (i) Identifier le rôle du complexe PRC2 et de la dynamique H3K27me3 dans la réponse aux variations nutritionnelles, en utilisant comme premier modèle *NRT2.1*, puis la réponse à l'échelle du génome.
- (ii) Etudier la fonction d'IWS1/HNI9 dans la signalisation nutritionnelle
- (iii) Identifier la nature de 2 autres mutants *hni* isolés dans le crible génétique.

2.4.2. Résultats

Rôle du complexe PRC2 et de la dynamique H3K27me3 dans la régulation transcriptionnelle en réponse aux variations nutritionnelles

H3K27me3 est une marque chromatinienne associée à un état répressif de la chromatine et aux gènes transcriptionnellement réprimés dans le génome (Grimanelli and Roudier, 2013). Cette marque est mise en place par le complexe PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2), très conservé chez les eucaryotes. Suite à l'observation de la dynamique H3K27me3 au locus *NRT2.1* en réponse aux variations nutritionnelles, nous avons cherché à étudier le rôle de cette marque chromatinienne dans la régulation de *NRT2.1*. Ce travail correspond en grande partie au travail de Fanny Bellegarde, actuellement en 3^{ème} année de thèse, que je co-encadre avec Alain Gojon (Fanny Bellegarde a également réalisé son stage de M1 dans l'équipe sur cette thématique). Juliette Chantrenne, stagiaire M2 de l'ENSAIA de Nancy, et Marianne Rougier, stagiaire M1 de l'Université de Montpellier, ont également contribué à ce projet.

Afin d'étudier le rôle de H3K27me3 dans la régulation de *NRT2.1*, des mutations pour les principales H3K27 méthyltransférases du complexe PRC2, CURLY LEAF (CLF) et SWINGER (SWN), ont été introduites dans une lignée *ProNRT2.1:GUS*. Nous avons dans un premier temps étudié l'importance de ces marques répressives en condition de forte teneur en azote, répressive pour *NRT2.1*. Nous observons un enrichissement en H3K27me3 sur le promoteur *NRT2.1*, qui est très largement réduit dans le mutant *clf-29*, peu affecté dans le mutant *swn-3*, et totalement perdu dans le double mutant (Fig. 6A). Ces résultats indiquent que CLF est la principale méthyltransférase impliquée dans l'enrichissement H3K27me3 au locus *NRT2.1*, et, en accord avec la bibliographie, une certaine redondance entre CLF et SWN. Cette diminution en H3K27me3 est accompagnée d'une augmentation en H3K4me3, marque chromatinienne associée à l'activation transcriptionnelle. Cependant, on n'observe aucun impact de ce changement d'état chromatinienn sur les niveaux de transcrits GUS (Fig. 6A), ce qui est confirmé par les colorations histochimiques réalisés sur les différents fonds génétiques (Fig. 6B). Ces résultats démontrent (i) que la mise en place des marques H3K27me3 n'est pas déterminante de la répression du gène *NRT2.1* en condition de forte

teneur en azote, et (ii) que la signalisation IWS1/HNI9 est vraisemblablement indépendante de PRC2 et H3K27me3.

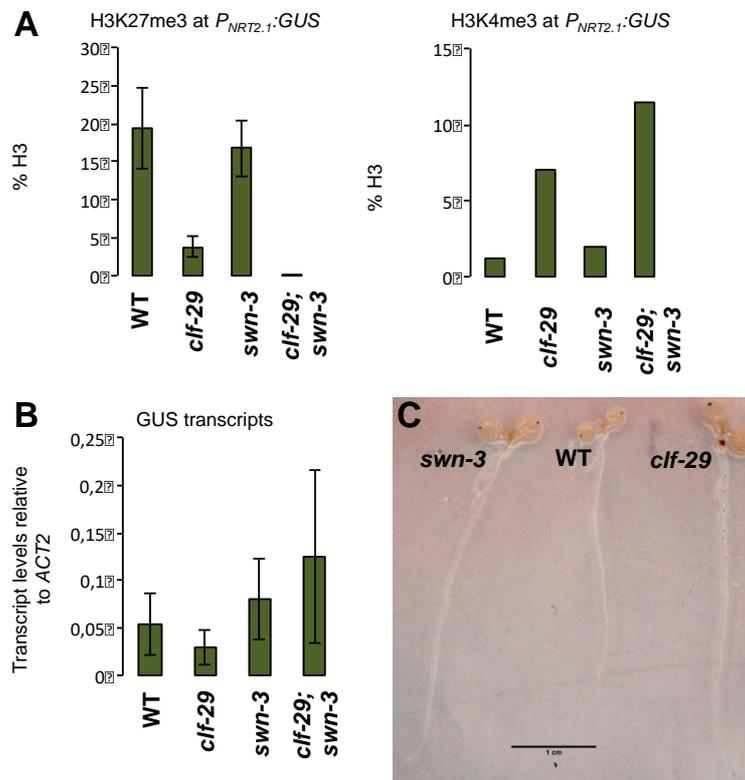


Figure 6: **A.** Effet des mutations *clf-29*, *swn-3* et *clf-29;swn-3* sur l'expression de *NRT2.1* **en condition de fort N**. Changement d'état chromatinien au locus $P_{NRT2.1}:GUS$ dans les mutants *clf-29*, *swn-3* et *clf-29;swn-3*. **B.** Niveaux de transcrits *GUS* dans les mutants *clf-29*, *swn-3* et *clf-29;swn-3*. **C.** Coloration histochimique révélant l'activité du promoteur *NRT2.1* dans les fonds mutants *clf-29*, *swn-3* et *clf-29;swn-3*.

Dans un second temps, nous avons étudié le rôle de ces marques répressives en condition de faible azote, activatrice pour *NRT2.1*. De manière surprenante, nous retrouvons dans ces conditions un fort enrichissement en H3K27me3 sur le promoteur *NRT2.1*. Cet enrichissement est également très réduit chez *clf-29*, accompagné d'un enrichissement en H3K4me3 (Fig. 7A). De plus, à l'inverse des conditions fort azote, ce changement d'état chromatinien chez *clf-29* est accompagné d'une augmentation de l'activité du promoteur *NRT2.1*, comme l'indiquent les niveaux de transcrits *GUS* et les colorations histochimiques (Fig. 7B-C). Ceci suggère un rôle de modulateur de l'expression plus que de répresseur pour PRC2 dans ce contexte où *NRT2.1* est fortement exprimé. Cette fonction originale pour un complexe chromatinien répresseur tel que PRC2 dans des conditions permissives pour la transcription n'a jamais encore été mis en évidence.

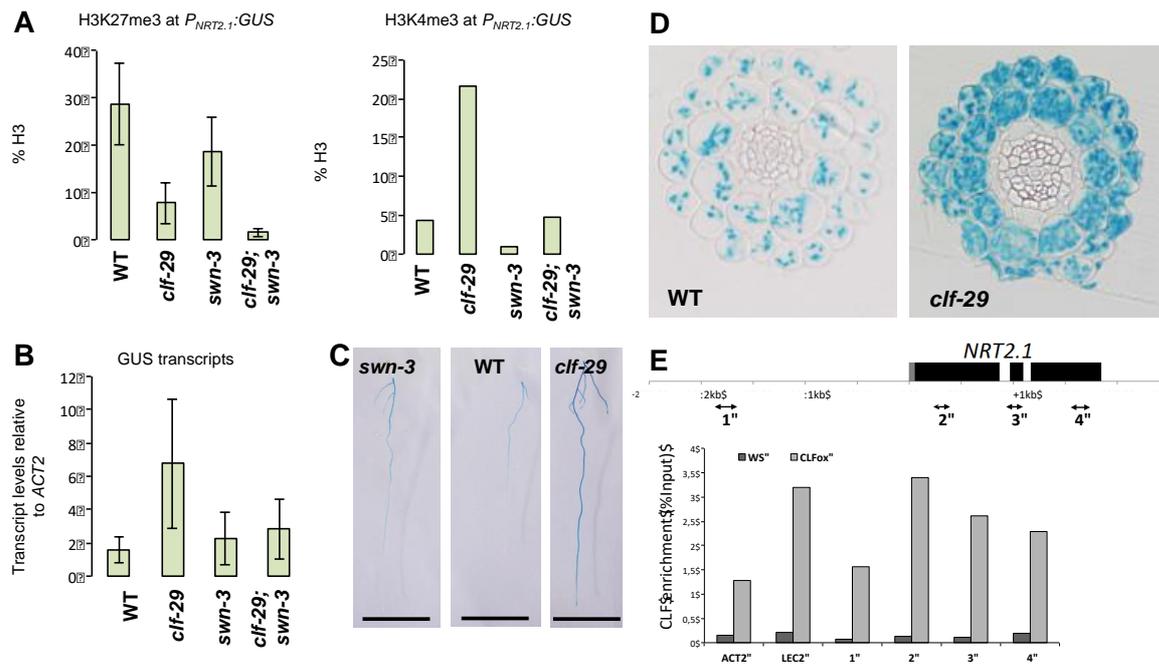


Figure 7: A. Effet des mutations *clf-29*, *swm-3* et *clf-29;swm-3* sur l'expression de *NRT2.1* en condition de faible N. Changement d'état chromatinien au locus $P_{NRT2.1}:GUS$ dans les mutants *clf-29*, *swm-3* et *clf-29;swm-3*. **B.** Niveaux de transcrits *GUS* dans les mutants *clf-29*, *swm-3* et *clf-29;swm-3*. **C.** Coloration histochimique révélant l'activité du promoteur *NRT2.1* dans les fonds mutants *clf-29*, *swm-3* et *clf-29;swm-3*. **D.** Coupes transversales de racines après coloration histochimique révélant l'activité du promoteur *NRT2.1* dans les fonds mutants *clf-29*, *swm-3* et *clf-29;swm-3*. **E.** ChIP anti-GFP au locus *NRT2.1* dans les lignées *35S:GFP:CLF* et *WS*. Les locus *ACT2* et *LEC2* sont utilisés comme contrôles négatifs et positifs, respectivement.

PRC2 et H3K27me3 sont impliqués dans la mise en place des profils d'expression tissu-spécifique. Afin d'obtenir plus d'informations sur la dérégulation de l'expression de *NRT2.1* dans *clf-29*, nous avons réalisé des coupes transversales de racines sur les lignées $P_{NRT2.1}:GUS$ WT et *clf-29* (Fig 7D). Les résultats montrent très clairement que le profil spatial d'expression de *NRT2.1* n'est pas perturbé, mais que les niveaux d'expression dans le cortex et l'épiderme sont contrôlés par CLF. La modulation de l'expression du promoteur *NRT2.1*, plus que sa répression, suggère à nouveau un rôle original pour PRC2 et H3K27me3. Afin de valider cette hypothèse, il est nécessaire de montrer que H3K27me3/PRC2 ciblent *NRT2.1* dans les tissus où ce gène est actif. Pour cela, des analyses de chromatine spécifiques du cortex et de l'épiderme ont été initiées, en collaboration avec François Roudier (IBENS, Paris). Les premiers résultats, préliminaires, suggèrent effectivement un marquage H3K27me3 dans le cortex, et renforcent nos hypothèses.

Enfin, afin de montrer le rôle direct de CLF au locus *NRT2.1*, nous avons réaliser une ChIP anti-GFP en utilisant une lignée *35S:GFP:CLF*. Les résultats montrent clairement un enrichissement de CLF au locus *NRT2.1*, en particulier en 5' du gène (Fig. 7E). L'analyse des différents régulateurs transcriptionnels connus de *NRT2.1* en fond *clf-29* ne montre pas de variations, renforçant l'hypothèse d'un rôle direct de CLF sur *NRT2.1*. Afin d'étendre ces

résultats à d'autres acteurs de la réponse aux variations en N, nous avons analysé l'enrichissement en marques chromatinienne H3K27me3 sur d'autres transporteurs, notamment *NRT2.1*, *NRT2.5*, et *NRT1.1*. Ces trois transporteurs montrent également un marquage H3K27me3 significatif, et l'analyse des transcrits en fond *clf-29* montre une augmentation significative de l'expression de *NRT1.1*.

Ce travail met donc en avant un mécanisme original de régulation à travers PRC2 et H3K27me3. En effet, dans le cas de la régulation de *NRT2.1*, H3K27me3 n'est pas utilisé comme strict répresseur transcriptionnel, mais comme modulateur de l'expression dans des conditions d'activation de la transcription. Les analyses en cours de chromatine spécifique de certains types cellulaires permettront de confirmer ce rôle, et éventuellement de tester la présence d'un état chromatinien bivalent (actif/répressif) au locus *NRT2.1*. L'ensemble de ce travail sur la régulation de *NRT2.1* par H3K27me3/PRC2 va être valorisé par une publication dont la rédaction devrait débuter au début de l'année 2017.

Ce modèle *NRT2.1* permet aussi de tester les interactions entre facteurs de transcription et états chromatinien. En effet, la diminution de marques répressives H3K27me3 dans un contexte où les facteurs de transcription activateurs sont présents permet de poser la question du rôle de la chromatine répressive dans la fixation de ces facteurs de transcription. Nous avons donc ici un modèle privilégié pour étudier cette question. En collaboration avec Anne Krapp (IJPB Versailles), François Roudier (IBENS, Paris) et Rodrigo Gutierrez (Universidad Catolica de Chile), la fixation de facteurs de transcription connus pour activer *NRT2.1* (NLP7, TGA1, TGA4) sera testé dans des lignées WT et mutantes pour des membres du complexe PRC2, notamment CLF.

Un autre aspect original de ce travail est le contraste que nous avons observé entre l'activité du promoteur *NRT2.1* et les variations de niveaux de transcrits *NRT2.1*. En effet, si l'activité du promoteur est modulée par CLF (coloration histochimiques et transcrits GUS), les niveaux de transcrits *NRT2.1* ne sont pas impactés dans *clf-29*, bien que l'état chromatinien au locus *NRT2.1* soit modifié de la même manière que pour le gène rapporteur (plusieurs gènes rapporteurs, incluant plusieurs lignées indépendantes, ont confirmé les résultats dans *clf-29* et excluent un effet de position). Ceci laisse penser qu'un mécanisme post-transcriptionnel agirait en deuxième contrôle pour réguler spécifiquement les niveaux de transcrits *NRT2.1*. Nous poursuivons donc également l'analyse des liens entre régulation transcriptionnelle via PRC2 et post-transcriptionnelle (notamment via la surveillance des ARNm) dans le contrôle de *NRT2.1*.

Rôle de *HNI9/IWS1* dans la réponse aux variations en N

Les résultats présentés sur le rôle de HNI9 dans la réponse aux variations en N correspondent en partie aux travaux effectués par Thomas Gayraud lors de son stage de M2, et Amel Maghiaoui lors de son stage de M1, tous les deux étudiants à l'Université de Montpellier.

Le facteur chromatinien *HNI9/IWS1* a été isolé par crible génétique comme étant important pour la répression transcriptionnelle du gène *NRT2.1* en condition de fort N. Cependant,

aucune donnée ne montre un rôle direct d'IWS1 au locus *NRT2.1*. A l'inverse, de nombreuses données bibliographiques indiquent pour IWS1 un rôle dans l'activation de l'expression des gènes. Chez l'humain notamment, il a été montré qu'un complexe associant des H3K27 déméthylases, SPT6 et IWS1 (entre autres) contribuait à la transition de certains gènes d'un état réprimé à un état exprimé (Chen *et al.*, 2012). Afin d'explorer la signalisation HNI9 et ses cibles génomiques en réponse aux variations en N, nous avons utilisé les transcriptomes WT vs. *hni9-1* réalisés en faible et fort N. Nous avons sélectionné dans ces transcriptomes les gènes induits par les fortes teneurs en N chez le WT, et perdant cette induction chez *hni9-1*. Une centaine de gènes semblent donc induits par les fortes teneurs en N, de manière dépendante de HNI9. L'analyse de la fonction de ces gènes montre un enrichissement significatif de la catégorie fonctionnelle "réaction d'oxydo-réduction". Nous avons donc récemment testé l'hypothèse selon laquelle HNI9 permettrait l'activation d'un programme génomique permettant la prise en charge des espèces réactives de l'oxygène (ROS) générées par les fortes teneurs en N.

Des analyses des niveaux de ROS montrent que les fortes concentrations en N entraînent effectivement la production de ROS. Chez le WT, l'activation des gènes impliqués dans les réactions d'oxydo-réduction (peroxydases, catalases, cytochrome P450, etc.) permettrait de détoxifier ces ROS. Chez le mutant *hni9-1*, les niveaux de ROS sont significativement plus élevés en fort N que chez le WT, entraînant un stress oxydatif. L'hypothèse d'un effet du stress oxydatif sur la régulation du transport du nitrate, et en particulier la régulation de *NRT2.1*, a déjà été évoquée dans l'équipe (Lejay *et al.*, 2003), et semble donc être une voie intéressante pour expliquer le phénotype de dérégulation de *NRT2.1* dans le mutant *hni9-1*. Plus généralement, l'intérêt est ici d'étudier l'activation d'un programme de réponse au stress par un complexe chromatinien. Chez l'humain, IWS1/HNI9 agit en complexe avec des H3K27 déméthylases et une H3K36 triméthyltransférase. Suite à des analyses de chromatine, nous avons montré que la dynamique H3K27me3 et les protéines H3K27 déméthylases n'étaient que très peu impliquées dans l'activation HNI9-dépendante des gènes de réponse au stress oxydatif. L'implication de la dynamique H3K36me3 dans cette réponse sera prochainement testée.

Identification et caractérisation des mutants *hni48* et *hni140*

Une partie des résultats présentés sur l'identification et la caractérisation des mutants *hni48* et *hni140* correspond aux travaux effectués par Amel Maghiaoui, étudiante à l'Université de Montpellier, lors de son stage de M1.

Le crible génétique de dérégulation transcriptionnelle de *NRT2.1*, ayant mené à HNI9, a également permis d'isoler une série d'autres mutants *hni*, dont *hni48* et *hni140*. Nous avons entrepris de cloner ces mutants, d'une part pour identifier de nouveaux acteurs de la régulation de *NRT2.1*, mais également avec l'hypothèse que ces mutants pourraient aider à la compréhension du rôle et de la signalisation *hni9*. L'objectif était de pouvoir intégrer ces mutants dans le projet 'dynamique chromatinienne et réponse à l'N'. Le clonage de ces 2 mutants a été réalisé par séquençage, et 2 mutations ont été identifiées dans le même gène *AT1G66200/GLN1.2*, codant pour une isoforme de la glutamine synthétase cytosolique (GS1). La GS1 est une des enzymes qui participent à l'assimilation du nitrate dans les acides

aminés. *GLN1.2* est induit transcriptionnellement par les fortes teneurs en azote, mais nous n'avons identifié aucun lien entre son induction et HNI9 (pas de phénotype de perte d'induction dans le mutant *hni9-1* par exemple). Les signalisations liées à HNI48 et HNI140 semblent donc découplées de la signalisation HNI9, et ne permettent pas d'avancée dans la compréhension du rôle de la dynamique chromatinienne dans la réponse à l'N. Cet axe de recherche HNI48/140 ne sera donc pas poursuivi, mais un effort sera fait pour valoriser le travail ayant mené à leur identification.

3. Projet de recherche

Le projet de recherche que je souhaite développer s'articule en 3 parties:

(i) Une approche intégrative de la régulation de l'adaptation à la carence en nitrate. Cette partie s'appuie largement sur les acquis obtenus sur l'impact de la dynamique chromatinienne dans l'adaptation nutritionnelle à BPMP. C'est un projet en phase d'exploitation, pour lequel nous avons déjà mis en évidence la pertinence scientifique (voir partie 2.4.2). Les concepts autour de ce projet sont bien maîtrisés, et les outils sont disponibles ou peuvent être développés rapidement. C'est donc un projet sûr en terme de faisabilité. L'originalité de ce projet est également très forte, puisque très peu d'études à ce jour se sont focalisées sur l'importance de la dynamique chromatinienne dans la régulation de la nutrition chez les plantes. Pour ces raisons ce projet sera le terrain privilégié pour l'encadrement d'étudiants. Un étudiant de M2 de l'Université de Montpellier va d'ailleurs effectuer son stage sur une partie de ce projet, et un sujet de thèse sera proposée à l'école doctorale GAIA pour la rentrée 2017/2018. Concrètement, ce projet consistera à analyser la **signalisation de la déméthylation H3K27me3** dans la réponse à la carence en NO_3^- , et à **intégrer les régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles** dans la réponse à la carence en NO_3^- . Ce projet sera mené sur des **approches ciblées et génomiques**, et principalement à **l'échelle tissu-spécifique**.

(ii) Une approche de biologie des systèmes pour comprendre l'effet du changement climatique sur la nutrition minérale des plantes. Cette partie correspond à un projet au développement à plus long terme, qui s'appuie principalement sur des observations bibliographiques montrant que le changement climatique (notamment l'élévation de la concentration en CO_2 atmosphérique) a un effet négatif sur la nutrition minérale des plantes. Les connaissances font totalement défaut pour expliquer ce phénomène, et je souhaite développer une approche ouverte de biologie des systèmes pour y répondre. Ce projet combinera des **approches de protéo-génomique et de biologie comparative**. C'est un projet exploratoire, à risque, pour lequel l'encadrement se tournera principalement vers des ingénieurs et techniciens qui ne porteront pas ce risque.

(iii) Le développement de nouveaux outils pour l'étude des interactions entre séquences régulatrices et facteurs de transcription. L'analyse de l'interaction entre facteurs de transcription et séquences régulatrices est cruciale dans les projets (i) et (ii), mais également dans de très nombreux projets qui visent à étudier les régulations de l'expression du génome. Pour autant, les méthodes actuelles sont très limitées, et le développement d'innovations méthodologiques est essentiel pour lever de nouveaux verrous. Ce projet de développement technologique, en collaboration avec des chimistes des interactions, a pour objectif de produire **une méthode innovante pour l'étude des interactions séquences régulatrices/facteurs de transcription**.

3.1. Une approche intégrative de la régulation de l'adaptation à la carence en nitrate

Les travaux effectués sur la régulation chromatinienne de *NRT2.1* ont montré que H3K27me3 et le complexe PRC2 modulait l'expression de ce gène en conditions où son expression est forte. Cet axe de recherche constitue la suite logique de ces travaux, et se focalisera d'une part sur le rôle de la dynamique H3K27me3 dans l'activation d'un programme de réponse à la carence en NO_3^- , puis sur l'intégration entre régulations transcriptionnelles (chromatinienne) et post-transcriptionnelle (surveillance des ARNm) dans la réponse à la carence en nitrate.

3.1.1. Signalisation de la carence en NO_3^- et dé-répression chromatinienne

Lorsque les plantes passent d'une situation de nutrition abondante (10 mM NO_3^-) à une situation de carence ou de forte limitation (entre 0 et 0,5 mM NO_3^-), des systèmes de transport de NO_3^- à haute et très haute affinités sont activés pour permettre de puiser le NO_3^- disponible dans le milieu. Parmi ces systèmes, on retrouve les gènes modèles *NRT2.1*, *NRT2.4* et *NRT2.5* (Kiba and Krapp, 2016) (Fig. 8A). Le phénotype du triple mutant montre que ces transporteurs ont un rôle additif: le triple mutant *nrt2.1;nrt2.4;nrt2.5* ne peut pas se développer dans ces conditions de forte limitation en NO_3^- (0,5 mM NO_3^-) (Lezhneva *et al.*, 2014) (Fig. 8B). La régulation de ces 3 gènes représente donc un excellent modèle dans l'étude de la réponse à la carence en NO_3^- .

Plusieurs observations nous indiquent que la déméthylation H3K27me3 pourrait avoir un rôle dans cette dynamique d'expression, en particulier sur *NRT2.1*. Premièrement, nos résultats (voir partie 2.4.2) montrent que diminuer les niveaux de cette marque chromatinienne a pour effet d'augmenter l'expression de *NRT2.1*. Deuxièmement, des travaux ont montré que la signalisation miR169 contribuait à l'activation de *NRT2.1* en situation de carence (Zhao *et al.*, 2011) (Fig. 8C). Cette signalisation implique miR169 et ses cibles, les transcrits des gènes NF-YA (notamment NF-YA2 et NF-YA5, qui sont induits lors d'une carence en N). Or, il a été également montré, dans un contexte d'étude de la floraison, que les facteurs NF-YA étaient des médiateurs de la déméthylation de H3K27me3, en agissant comme partenaire de la protéine déméthylase REF6 (Hou *et al.*, 2014). Enfin, il faut noter que nous observons également un marquage H3K27me3 sur les locus *NRT2.4* et *NRT2.5*, indiquant que ces gènes pourraient être des cibles d'une dynamique de cette marque.

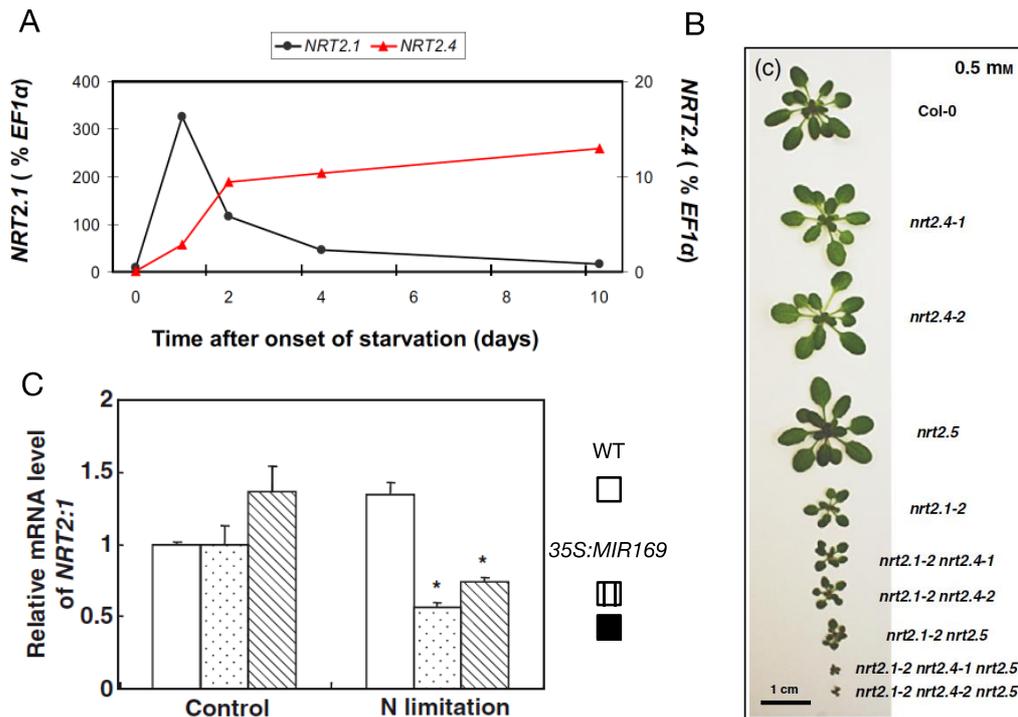


Figure 8: A. Cinétique d'expression de *NRT2.1* et *NRT2.4* en réponse à une carence en nitrate. B. Phénotype de croissance de lignées mutantes pour les gènes *NRT2.1*, *NRT2.4*, *NRT2.5* et leur combinaison. C. Effet de la surexpression de *miR169* sur l'expression de *NRT2.1* en condition limitante en N. Données issues respectivement de Kiba et al., 2012 (A), Lezhneva et al., 2014 (B), et Zhao et al., 2011 (C).

Je souhaite donc étudier dans le détail la contribution de la signalisation de la déméthylation de H3K27me3 dans l'activation de ces gènes en réponse à la carence en NO_3^- (Fig. 9A). Pour cela, 3 approches seront menées en parallèle:

Le rôle du module de régulation *miR169*/*NF-YA* sera analysé, notamment en étudiant l'état chromatinien aux locus *NRT2.1*, *NRT2.4* et *NRT2.5* dans des lignées surexprimant *miR169* ou mutantes pour *miR169* (Target Mimicry, et par conséquent surexprimant certains *NF-YA*), et pour une cinétique du passage de 10 mM NO_3^- à 0,5 mM NO_3^- . Les lignées permettant cette analyse nous ont été fournies par l'équipe de Martin Crespi (IPS2, Saclay), qui étudie l'importance de ce module dans le développement des racines latérales.

Le rôle des protéines ayant une activité H3K27 méthylase sera analysé. Chez *Arabidopsis*, 2 sous-classes de protéines Jumonji, ayant une activité histone méthylase, ont été décrites comme ayant une spécificité pour H3K27me3. Il s'agit des protéines homologues REF6 et ELF6 (Crevillen et al., 2014; Lu et al., 2011), et des protéines homologues JMJ30 et JMJ32 (Gan et al., 2014). La protéine JMJ13, homologue de REF6 et ELF6, n'a pas été caractérisée à ce jour mais est pressentie pour avoir également une activité H3K27me3 méthylase. Nous avons identifié les lignées mutantes pour chacune de ces protéines, et isolé par croisements les doubles et triples mutants permettant de s'affranchir de la redondance fonctionnelle de ces protéines. Ceci représente en totalité 12 lignées mutantes pour la fonction H3K27me3 méthylase. Des résultats préliminaires sur la lignée mutante *elf6-3;jmj13-1;ref6-3* en

condition constitutive limitante en NO_3^- suggère un rôle de la déméthylation H3K27me3 dans l'expression de *NRT2.1* (Fig. 9B).

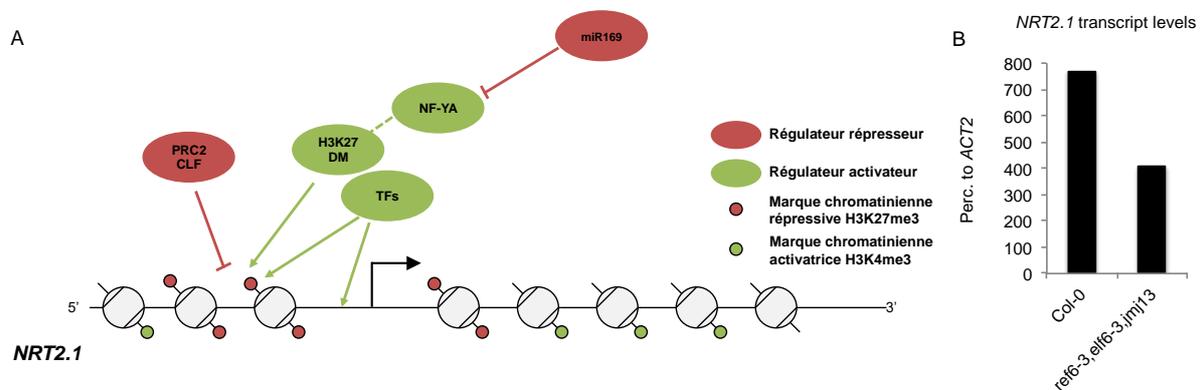


Figure 9: A. Modèle de travail sur la signalisation menant à la régulation chromatinienne de *NRT2.1*, incluant des acteurs répresseurs (*CLF*, *mir169*) et activateurs (*H3K27DM*, *TFs*, *NF-YA*). B. Niveaux de transcrits *NRT2.1* dans le triple mutant *elf6-3;jmj13-1;ref6-3*, en condition 0,3 mM NO_3^- , exprimé en pourcentage des niveaux de transcrits *ACT2*.

Pour chaque lignée mutante, l'expression de *NRT2.1*, *NRT2.4* et *NRT2.5*, ainsi que leur état chromatinien, sera étudié dans une cinétique du passage de 10 mM NO_3^- à 0,5 mM NO_3^- . Enfin, le phénotype d'adaptation à la carence nutritionnelle de ces lignées sera étudié sur robots de phénotypage à haut-débit. Nous disposons à BPMP d'un robot de phénotypage racinaire, et un robot de phénotypage de la croissance foliaire à l'IJPB de Versailles permet maintenant de réaliser des expériences en conditions de carence nutritionnelle.

3.1.2. Analyse type cellulaire-spécifique de la dynamique H3K27me3 aux locus *NRT2.1*, *NRT2.4* et *NRT2.5* en réponse à une carence en NO_3^-

Afin d'obtenir une meilleure résolution dans l'analyse de l'état chromatinien aux locus *NRT2.1*, *NRT2.4* et *NRT2.5* en réponse à une carence en NO_3^- , une analyse type-cellulaire spécifique sera réalisée. Les travaux réalisés précédemment sur la régulation chromatinienne de *NRT2.1* montrent que, dans la mesure du possible, la déconvolution de différents types cellulaires peut mettre en avant une régulation difficile à identifier. Nous utiliserons pour cela les lignées INTACT développées par les laboratoires d'Yvon Jaillais (RDP, Lyon), Grégory Vert (I2BC, Saclay) et François Roudier (IBENS, Paris) (Marques-Bueno *et al.*, 2016). Nous nous intéresserons aux lignées dont les noyaux sont marqués dans le cortex (*Pro:PEP*), l'épiderme (*Pro:EXP7*) et les tissus vasculaires (*Pro:SUC2*). Cette dernière lignée sert de contrôle pour un tissu où les mécanismes de prélèvement de NO_3^- ne sont pas activés. Ces lignées ont déjà été utilisées dans le cadre de la collaboration avec François Roudier (voir partie 2.4.2), et ont été amplifiées à BPMP.

3.1.3. Analyse épigénomique de la carence en NO_3^-

L'étude approfondie de la régulation des gènes *NRT2.1*, *NRT2.4* et *NRT2.5*, codant pour les systèmes de transport du NO_3^- , dans la réponse à la carence en NO_3^- par la signalisation chromatinienne est pleinement justifiée par le phénotype du triple mutant

nrt2.1;nrt2.4;nrt2.5 (Fig. 8B). Cependant, cette approche ciblée est aussi restrictive par nature, et une approche génomique sera menée en parallèle. L'objectif de cette approche génomique est d'acquérir des connaissances au delà des gènes codant pour les systèmes de transport de NO_3^- . L'intérêt, d'une part, est d'obtenir des informations sur les événements de régulations en amont de la régulation des systèmes de transport (par exemple sur les facteurs de transcription qui seraient eux même régulés transcriptionnellement) et ainsi de permettre de reconstituer les réseaux de gènes impliqués dans la réponse à la carence en NO_3^- . D'autre part, il est intéressant de s'intéresser aussi aux régulations des réseaux de gènes en aval des systèmes de transport, notamment ceux concernant l'assimilation du NO_3^- ou la coordination des métabolismes carbonés et azotés. Au niveau mécanistique, le fondement de cette approche réside dans l'idée qu'en condition de croissance optimale, des mécanismes de répression chromatinienne maintiennent les programmes de réponse au stress transcriptionnellement éteints, et que des mécanismes d'activation chromatinienne, en coopération avec des facteurs de transcription spécifiques, activent ces programmes génomiques lorsqu'un stress est ressenti. La dynamique H3K27me3 (méthylation vers déméthylation) correspond à ce type de mécanisme d'activation de la chromatine.

En cohérence avec la partie précédente et pour obtenir la meilleure résolution possible, l'étude de la mise en place d'un programme génomique de réponse à la carence en NO_3^- sera effectuée dans un contexte cellulaire spécifique (cortex et/ou épiderme). Premièrement, les niveaux de H3K27me3 seront cartographiés sur l'ensemble du génome par CHIP-seq, à différents points de la cinétique de transition de 10 mM NO_3^- vers 0,5 mM NO_3^- . En parallèle de l'épigénome H3K27me3, l'architecture de la chromatine sera analysée par ATAC-seq. L'analyse ATAC-seq permet d'isoler la chromatine ouverte, qui correspond aux sites de fixation de facteurs de transcription, et d'identifier ainsi entre échantillons la présence de facteurs de transcription sur l'ensemble du génome (Buenrostro *et al.*, 2013). Cette approche permettra de comparer la dynamique H3K27me3 à la présence de facteurs de transcription, et est dans la suite logique de l'étude de ces mêmes liens que nous avons entrepris au locus *NRT2.1* (voir partie 2.4.2), mais ici à l'échelle du génome. Ces analyses épigénomiques seront complétées par des analyses transcriptomiques. Laurence Lejay, chercheur dans l'équipe, a obtenu ou développe des lignées marquant les ribosomes spécifiques de certains types cellulaires, en utilisant notamment les mêmes promoteurs que ceux mentionnés plus haut. Ceci permettra une parfaite comparaison entre épigénome et transcriptome/translatome.

Enfin, l'ensemble de ces études pourra *in fine* être réalisé dans certains fonds génétiques de la signalisation de déméthylation H3K27me3 étudiés précédemment (voir partie 3.1.1). Les lignées ayant montré les résultats les plus pertinents seront croisées avec les lignées INTACT afin de combiner approche génétique et approche épigénomique type-cellulaire spécifique.

3.1.4. Intégration des contrôles transcriptionnels (chromatiniens) et post-transcriptionnels (stabilité des messagers) dans la réponse au nitrate

Un résultat surprenant obtenu dans le cadre de nos travaux sur la régulation chromatinienne de *NRT2.1* est le contraste observé entre l'activité du promoteur *NRT2.1* et les variations de

niveaux de transcrits *NRT2.1* dans un fond *clf-29*. En effet, si l'activité du promoteur est modulée par CLF (coloration histochimiques, transcrits GUS, état chromatinien du locus rapporteur), les niveaux de transcrits *NRT2.1* ne sont pas impactés dans *clf-29*, bien que l'état chromatinien au locus *NRT2.1* soit modifié de la même manière que pour le gène rapporteur (plusieurs gènes rapporteurs, incluant plusieurs lignées indépendantes, ont confirmé les résultats dans *clf-29* et excluent un effet de position). Ces observations suggèrent 2 hypothèses liées:

- (i) un mécanisme post-transcriptionnel spécifique de *NRT2.1* agirait à un deuxième niveau de contrôle pour réguler l'homéostasie des niveaux de transcrits *NRT2.1*. Cette hypothèse est en accord avec plusieurs observations qui montrent que les gènes de réponse au NO_3^- , et notamment certains gènes de transporteurs de NO_3^- , sont la cible d'une régulation post-transcriptionnelle (Bouguyon *et al.*, 2016; Menz *et al.*, 2016).
- (ii) plus généralement, la surveillance des ARNm pourrait être un mécanisme permettant de contrer les effets potentiellement délétères d'une dé-répression transcriptionnelle suite à une perte de fonction PRC2. En tant que telle, la surproduction de transcrits entraîne des effets négatifs sur le développement. Mais la génération de transcrits surabondants peut aussi conduire successivement à une prise en charge par des mécanismes de régulation type PTGS (Post Transcriptional Gene Silencing), puis TGS (Transcriptional Gene Silencing), qui a de la même manière des conséquences très négatives sur la physiologie de la plante (Mari-Ordonez *et al.*, 2013). Le maintien de l'homéostasie des transcrits est donc fondamental pour le bon fonctionnement d'une cellule. La dégradation des ARNm a d'ailleurs déjà été identifiée comme un mécanisme permettant de prévenir les effets exponentiels néfastes du silencing post-transcriptionnel (Gy *et al.*, 2007). En se basant sur le modèle *NRT2.1*, l'hypothèse à large échelle d'une coopération entre régulation chromatinienne via PRC2 et surveillance des ARNm, dans un but de maintenir l'homéostasie des ARNm, n'a jamais été explorée.

Ces 2 hypothèses seront testées successivement par des approches génétiques ou par l'utilisation de drogues spécifiques, ciblées sur *NRT2.1* ou à l'échelle du génome.

La très grande majorité des travaux de recherches mesurent l'expression d'un gène par les niveaux de transcrits. Cependant, les niveaux de transcrits dans une cellule correspondent à l'intégration de 2 mécanismes: la synthèse (transcription) et la stabilité (dégradation). Dans un premier temps, une approche simple consistera à étudier la stabilité des transcrits *NRT2.1* dans un fond WT et dans un fond *clf-29*. Ceci sera réalisé en traitant ces lignées à l'actinomycine D, qui a pour effet de bloquer la transcription. Lorsque l'activité transcriptionnelle est suspendue, la cinétique de diminution des niveaux de transcrits permet de mesurer leur stabilité. Cette approche relativement simple permettra d'avoir rapidement accès à la stabilité des transcrits *NRT2.1* dans le mutant *clf-29* en comparaison à un WT. Cependant, elle ne permet pas de quantifier l'activité transcriptionnelle. L'utilisation d'analogues de l'uridine comme le 4-thiouridine (4sU) permet de quantifier en parallèle l'activité transcriptionnelle et la dégradation des transcrits. Le 4sU est incorporé aux cellules *in vivo*, et utilisé dans la synthèse des ARNm, qui peuvent être purifiés après biotinylation.

En utilisant une cinétique simple, la purification des différentes composantes du pool des ARNm (ARNm totaux de départ au temps 0, ARNm non marqués au temps t, ARNm marqués au temps t) permet de calculer à la fois un temps de demi-vie et un taux de transcription. Cette méthode a été mise au point sur des cellules animales et végétales (Doidy *et al.*, 2016; Dolken *et al.*, 2008), et récemment utilisée sur des plantules d'*Arabidopsis* en culture liquide (Sidaway-Lee *et al.*, 2014). Cette approche sera donc utilisée sur des plantes WT et *clf-29* en condition de NO_3^- limitant (0,5 mM) afin d'explorer la contribution des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels dans la régulation de *NRT2.1*.

Dans le cadre d'une approche génétique, nous avons également initié le croisement entre le mutant *clf-29* et des lignées mutantes pour XRN2, XRN3 et XRN4, qui sont les principales exoribonucléases impliqués dans la surveillance des ARNm chez *Arabidopsis*. XRN4 contribue à la dégradation cytosolique des ARNm, XRN2 et XRN3 contribuent à la dégradation nucléaire des ARNm. Afin de tester les interactions entre CLF et XRNs, les niveaux de transcrits *NRT2.1* seront comparés entre les génotypes WT, *clf-29*, et la combinaison de mutants *clf-29;xrn4-5*, *clf-26;xrn2-1*, *clf-29;xrn3-3*, *clf-29;xrn2-1;xrn3-3*. Toutes les lignées contiennent un rapporteur transcriptionnel *ProNRT2.1:LUC*, qui permet à un autre niveau de découpler les régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles. Cette approche sera réalisée dans un premier temps en condition constante de limitation en NO_3^- , et pourra dans un deuxième temps être étendue à des conditions plus dynamiques (voir partie 3.1).

Indépendamment de la régulation propre à *NRT2.1*, les contributions et les liens entre contrôle chromatinien par PRC2 et du contrôle post-transcriptionnels par la stabilité des ARN messagers dans la réponse au NO_3^- seront explorés à l'échelle du génome. Le modèle physiologique sera similaire à celui utilisé dans le premier axe de recherche, c'est à dire la transition d'une condition favorable (10 mM NO_3^-) vers une carence en N (0,5 mM NO_3^-) (voir partie 3.1). Il est d'ailleurs intéressant de noter que la diminution de la stabilité de certains gènes de réponse au NO_3^- a été observé dans des conditions similaires (NO_3^- vers absence de NO_3^- (Menz *et al.*, 2016)).

Cette analyse génomique sera réalisée par 2 des approches utilisées dans le cadre de la régulation ciblée de *NRT2.1*. D'une part, le transcriptome des populations d'ARN purifiés après traitement au 4sU sera analysé par séquençage (approche utilisée à plusieurs reprises dans la littérature (Doidy *et al.*, 2016; Rabani *et al.*, 2011; Schwalb *et al.*, 2016; Sidaway-Lee *et al.*, 2014)). D'autre part, les transcriptomes des lignées WT, *clf-29*, *clf-29;xrn4-5*, *clf-26;xrn2-1*, *clf-29;xrn3-3*, *clf-29;xrn2-1;xrn3-3* seront analysés et comparés.

La combinaison de ces 2 approches (ciblées/génomiques) permettra d'évaluer, avec une résolution jusque là jamais explorée, la contribution, les cibles, et les liens entre régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles dans la réponse à une contrainte environnementale chez les plantes.

Cette partie 3.1 "Une approche intégrative de la régulation de l'adaptation à la carence en nitrate" correspond à projet en phase de production, qui présente un niveau élevé de faisabilité, sans contrainte majeure. L'approche intégrative, qui associe plusieurs niveaux de régulations, à différentes échelles, est au cœur des démarches de l'équipe, et bénéficiera

d'un fort soutien scientifique, technologique et humain (voir partie 4). Pour ces raisons l'encadrement d'étudiant, notamment en thèse, sera privilégié sur ce projet. Un sujet de thèse sera proposée à l'école doctorale GAIA pour la rentrée 2017/2018 sur les parties 3.1.1 à 3.1.3.

3.2. Une approche de biologie des systèmes pour comprendre l'effet du changement climatique sur la nutrition minérale des plantes.

Parmi les composantes du changement climatique, l'élévation continue de la concentration atmosphérique en CO₂ est un processus qui va se poursuivre pendant une bonne partie du 21^{ème} siècle, avec des niveaux prévisibles compris entre 750 à 1300 ppm en 2100. Indépendamment de ses conséquences sur le changement climatique, une teneur accrue en CO₂ dans l'atmosphère va impacter le fonctionnement des plantes, pour qui cette teneur est un facteur limitant de la photosynthèse. Chez les espèces de type C3, les modèles physiologiques prédisent qu'un doublement de la teneur en CO₂ entraîne une stimulation de la fixation de carbone de l'ordre de 40%, laissant espérer que l'augmentation de la concentration atmosphérique en CO₂ ait un effet favorable sur la croissance (effet dit de « fertilisation CO₂ », (Long *et al.*, 2006)). De très nombreuses études, notamment de FACE (Free-Air CO₂ Enrichment), ont été conduites pour aborder ces aspects. Deux conclusions majeures en émergent: (i) hormis pour quelques groupes d'espèces (ligneux forestiers, légumineuses), le gain de croissance est plus faible qu'attendu (de l'ordre de 10 à 20% pour un doublement de la concentration en CO₂, (Long *et al.*, 2006)), et (ii) **le statut minéral des plantes est négativement impacté**, surtout en ce qui concerne l'azote (Loladze, 2014; Myers *et al.*, 2014) (Fig. 10).

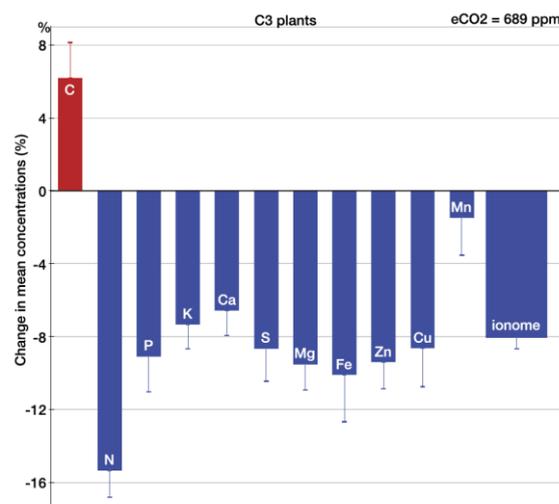


Figure 10: Effet de l'élévation de la teneur en CO₂ atmosphérique sur la composition minérale des plantes C3 (changement (%) en fort CO₂ en comparaison au CO₂ ambiant). Ces résultats sont la représentation d'une méta-analyse faite sur plus de 7000 jeux de données collectés sur 4 continents (Loladze, 2014).

Le faible effet positif sur la biomasse s'explique par une acclimatation des plantes à la concentration élevée en CO₂, associée à une diminution de l'efficacité de l'appareil

photosynthétique (Ainsworth and Long, 2005). La baisse du statut minéral des plantes (diminution de la teneur en éléments minéraux dans les tissus, y compris les graines) reste encore largement inexplicée (Taub and Wang, 2008), notamment parce qu'elle est également observée en condition de fourniture minérale non limitante (Soussana *et al.*, 2005). Ces considérations sont lourdes de conséquences pour le développement d'une agriculture durable, premièrement parce qu'il est à craindre que la recherche de l'effet « fertilisation CO₂ » sur le rendement conduise à une utilisation encore accrue des engrais minéraux (alors qu'elle est déjà excessive), et deuxièmement parce que toutes les études prédisent une baisse de qualité nutritionnelle des produits végétaux (teneurs en azote et autres minéraux diminuées) alors même que cette qualité est déjà insuffisante (pour les protéines et le fer en particulier). Rien ne permet à l'heure actuelle d'expliquer qu'une stimulation de la photosynthèse conduise à une diminution du statut minéral des plantes. Au contraire, un nombre considérable d'études montrent que la photosynthèse stimule (au moins à court terme) les systèmes racinaires de prélèvement des ions minéraux. Ce paradoxe a généré la proposition de plusieurs nouvelles hypothèses pour expliquer l'effet négatif à long terme du CO₂ élevé sur le statut minéral des plantes. Aucune de ces hypothèses n'est pour le moment validée, mais elles ont collectivement le mérite de révéler qu'un pan entier des mécanismes assurant la coordination entre photosynthèse et nutrition minérale échappe encore à notre compréhension.

Cette problématique scientifique, associée à un enjeu socio-économique très fort, représente un enjeu considérable, et une opportunité particulière pour BPMP, qui possède toutes les expertises pour y répondre. L'objectif est donc de développer une approche ambitieuse de biologie des systèmes, qui se prête parfaitement à une démarche exploratoire, où aucune hypothèse biologique ou physiologique n'est privilégiée. L'ambition de ce projet de biologie des systèmes est d'identifier les réseaux de régulation qui sont associés à l'impact du CO₂ élevé sur la nutrition minérale, pour ensuite nous permettre ou permettre à la communauté d'initier des stratégies permettant de produire ou sélectionner des plantes adaptées au changement climatique.

Cette démarche de biologie des systèmes combinera 2 approches: premièrement, un concept de protéogénomique, qui combinera des méthodes innovantes en biologie des systèmes, et deuxièmement une stratégie de biologie comparative, qui tirera profit de la capacité de certaines espèces à être mieux adaptées au fort CO₂. La plupart des approches d'étude des réseaux de régulation utilisent des données transcriptomiques, souvent associées à des prédictions de motifs cis-régulateurs, et plus rarement à des données d'interactions ADN-facteurs de transcription (Taylor-Teeple *et al.*, 2015; Tian *et al.*, 2014). Plus rarement, des données de protéomiques sont utilisées seules (Petricka *et al.*, 2012), ou en combinaison avec des données d'expression de gènes (Baerenfaller *et al.*, 2008). Ces dernières études montrent que l'intégration de données complémentaires (transcriptome/protéome, ou transcriptome/interaction protéines-ADN) augmente significativement le potentiel d'identification des réseaux de régulation (Nesvizhskii, 2014; Wang *et al.*, 2016). Afin d'explorer les réseaux de régulation dans ce contexte biologique, une approche innovante de protéogénomique intégrant 3 types de données sera donc

développée: transcriptomes, épigénomes et protéomes seront réalisés par RNA-seq, ATAC-seq et séquençage par spectrométrie de masse.

- 1) les données de transcriptome permettront l'identification des réseaux de gènes impliqués dans cette réponse,
- 2) l'épigénome par ATAC-seq permettra d'identifier les sites régulateurs effectivement ciblés par des facteurs de transcription, et d'identifier les séquences régulatrices réellement impliquées dans les réseaux de gènes,
- 3) le protéome sera mis en corrélation d'une part avec les sites régulateurs identifiés par l'analyse épigénomique, et d'autre part avec les données transcriptomiques.

Ces 3 types de données rentrent ainsi dans une boucle d'information itérative, où chaque information est à même de représenter une valeur ajoutée informative pour les suivantes.

En pratique, les plantes seront donc soumises à des conditions de forte concentration en CO₂, et leur réponse sera analysée pour des temps courts (de l'ordre de 24h, où l'on observe une stimulation des systèmes de transports ioniques), et des périodes plus longues (de l'ordre de plusieurs semaines, où l'on observe un impact négatif sur l'ensemble du statut minéral). L'étude sera principalement menée sur les racines, qui sont les organes de perception, d'acquisition et dans une certaine mesure d'assimilation des nutriments. L'analyse sur les parties foliaires pourra être réalisée dans un deuxième temps.

Concernant l'approche de biologie comparative, cette étude de biologie des systèmes sera menée de front sur 3 espèces, qui ont pour avantage de présenter une réponse contrastée au fort CO₂: *Arabidopsis*, *Medicago truncatula*, et le maïs. En effet, les légumineuses comme *Medicago*, et les plantes C4 comme le maïs, sont plus modérément affectées par l'élévation des teneurs en CO₂. C'est relativement intuitif pour les plantes C4, qui sont par nature pré-adaptées aux fortes concentrations en CO₂. Dans le cas des légumineuses, le lien avec la fixation azotée est évidemment tentante, mais (i) aucune étude physiologique n'a clairement démontré l'impact de la fixation symbiotique sur la réponse au fort CO₂, et (ii) l'effet sur l'ensemble de la composition minérale suggère un effet plus global que simplement sur la nutrition azotée. En comparaison à *Arabidopsis*, dont le statut minéral est affecté en réponse au fort CO₂, ces 2 espèces présentent donc des mécanismes de régulation vraisemblablement différents. Les réseaux de régulation de chaque espèce en réponse au fort CO₂ seront comparés pour en sortir les modules d'intérêt permettant aux plantes de s'adapter à l'élévation des teneurs en CO₂ atmosphérique (Fig. 11).

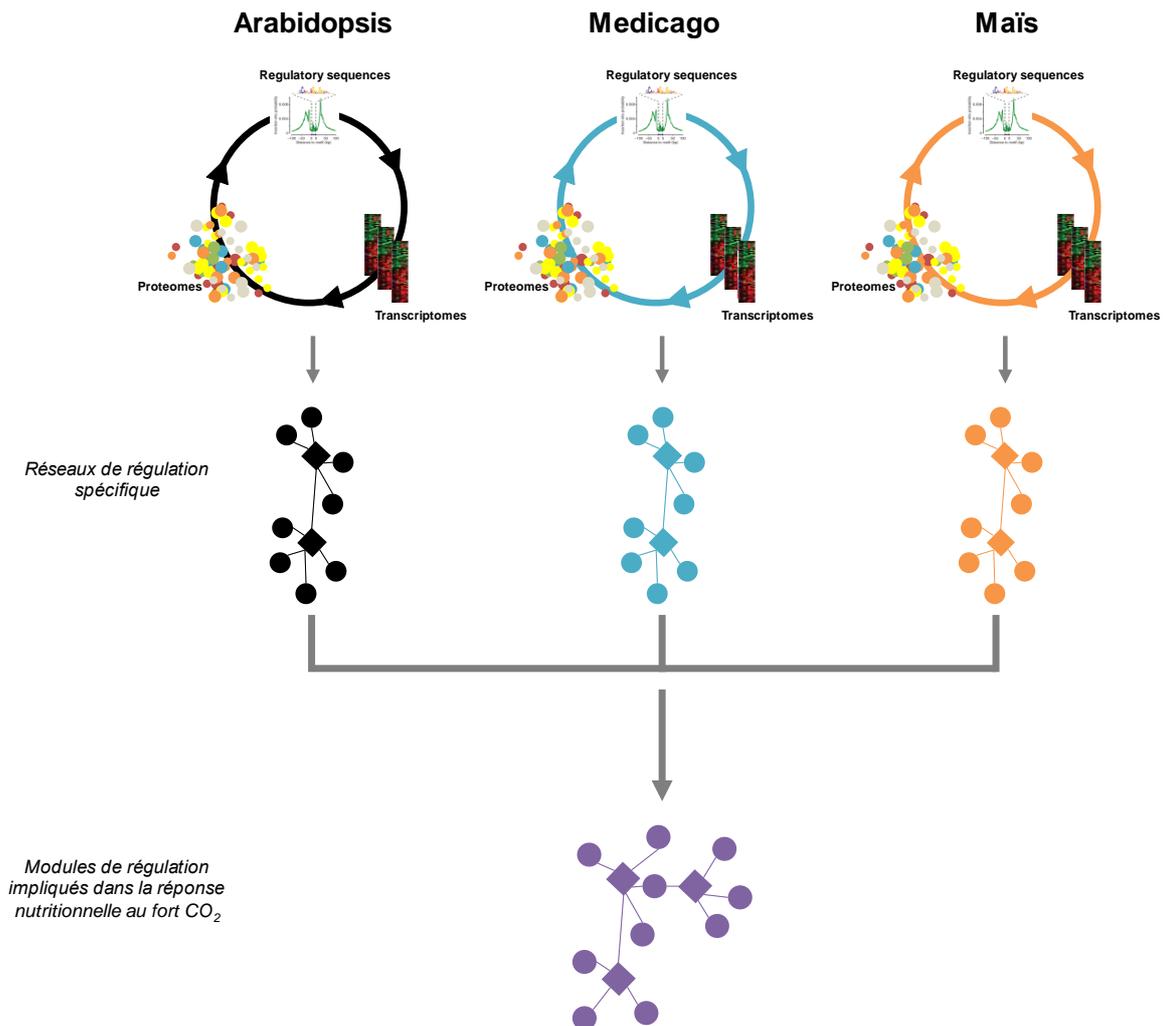


Figure 11: Démarche de biologie des systèmes pour comprendre l'effet du changement climatique sur la nutrition minérale des plantes.

3.3. Vers une nouvelle méthode d'étude des interactions entre séquences régulatrices et facteurs de transcription.

Les études de génomiques qui ont pour objectif d'identifier les réseaux de régulations sont toujours limitées par la difficulté d'étudier expérimentalement les interactions entre séquences régulatrices et facteurs de transcription. C'est en particulier le cas lorsqu'il s'agit d'identifier sans *a priori* les facteurs de transcription, et les complexes associés, qui se fixent sur un promoteur, ou plus précisément une séquence régulatrice située le plus souvent dans le promoteur d'un gène (approche dite 'gene-centered'). La méthode la plus utilisée à ce jour est le simple hybride, qui consiste à intégrer une séquence d'ADN dans un vecteur de levure et de lui soumettre une banque de protéines recombinantes, également dans un système levure. Des avancées très significatives ont été faites dans ce domaine, permettant l'identification de réseaux de régulation avancés (De Lucas and Brady, 2013), mais ce système reste très laborieux et fastidieux, et les limites qu'il montre sont majeures, notamment au niveau de la conformation des protéines recombinantes ou du nombre de

cibles testées. A l'opposé, l'étude des séquences régulatrices qui correspondent à un facteur de transcription ou à un régulateur chromatinien (approche dite 'TF-centered') montre plus de potentialités. Pour un facteur donné, le CHIP-seq est une méthode abordable, dès lors que les outils sont disponibles (anticorps spécifiques, lignées taggées). Récemment une méthode à plus large échelle, le DAP-seq, a été développée en utilisant des facteurs de transcription recombinants (synthétisés *in vitro*) soumis à de l'ADN génomique fragmenté, puis séquencé après association (O'Malley *et al.*, 2016), permettant d'isoler de manière abordable et efficace les sites de fixation de facteurs de transcription.

Pour autant, les données qui font principalement défaut pour faire avancer et évoluer les réseaux de régulation sont plutôt celles qui ont pour origine les séquences régulatrices pour retourner vers les facteurs de transcription (approche 'gene-centered').

En collaboration avec Joseph Chamieh, chimiste des interactions à l'Institut des Biomolécules de l'Université de Montpellier, nous souhaitons développer un système dans la théorie similaire au DAP-seq, mais qui utilise non pas les facteurs de transcription comme point de départ, mais les séquences régulatrices ('gene-centered' vs 'TF-centered'). Ce système sera intégré dans une approche de biologie des systèmes similaires à celle présentée précédemment, et permettrait d'explorer à large échelle les interactions entre séquences régulatrices et facteurs de transcription et les réseaux de régulations qui en découlent.

Le déroulement schématique de cette méthode est représenté sur la figure 12:

- Dans un premier temps, les séquences régulatrices spécifiques d'un type cellulaire impliquées dans une réponse biologique seront identifiées par ATAC-seq (voir partie 3.3.1).
- Ces séquences régulatrices seront ensuite synthétisées et fixées sur un sorbant dans un capillaire HPLC, lui même couplé à un spectromètre de masse.
- En parallèle, le protéome nucléaire du même type cellulaire sera isolé en conditions natives.
- Le protéome nucléaire sera soumis aux séquences régulatrices immobilisées, et les complexes fixés seront dirigés vers le spectromètre de masse pour séquençage.
- L'analyse du séquençage protéique permettra d'identifier les facteurs et éventuellement les complexes associés, l'ensemble issu d'un contexte biologique ciblé.

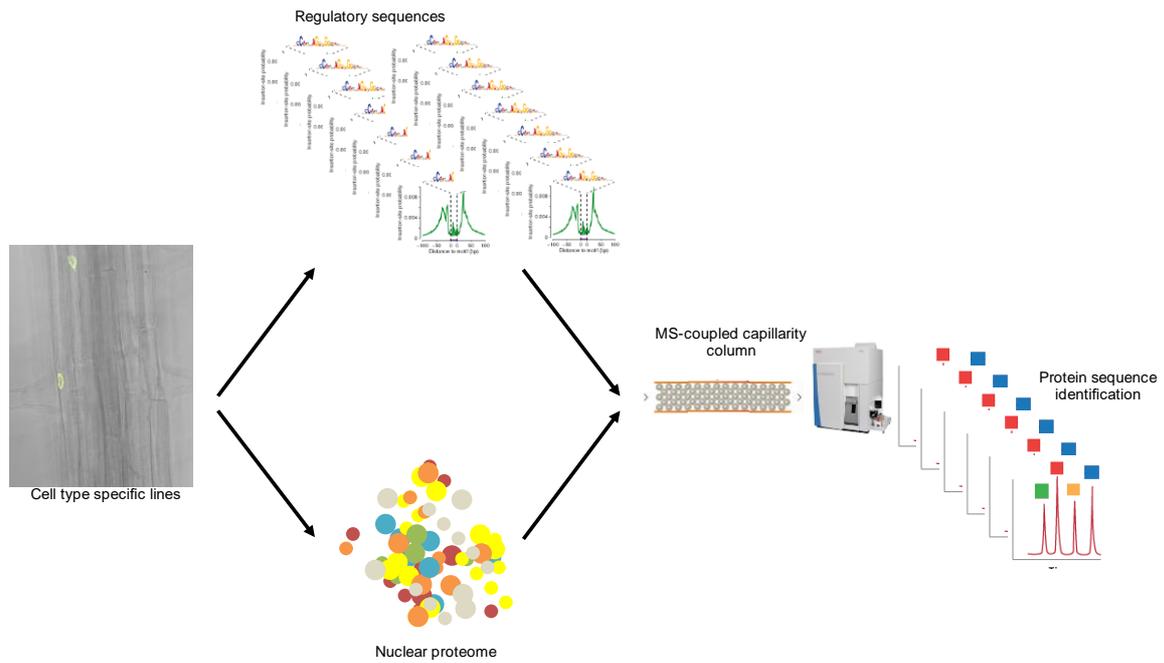


Figure 12: Illustration d'une méthode innovante permettant l'analyse des interactions ADN/protéines à large échelle.

La mise en place de ce type de méthode augmenterait de manière significative les approches de biologie des systèmes, et constituerait une avancée majeure dans l'analyse des interactions ADN/protéines pour la communauté scientifique.

4. Intégration dans le paysage local, moyens financiers et humains, et collaborations stratégiques

Le laboratoire BPMP a développé une forte identité sur l'étude des régulations du statut hydrominéral chez les plantes, et plus largement sur la réponse des plantes à leur environnement. Depuis quelques années, BPMP a également montré une évolution vers des approches globales, tournées vers la biologie des systèmes. Le projet que je souhaite développer s'intègre parfaitement dans ce contexte, et offre en plus une expertise dans l'analyse de l'expression du génome, de la chromatine, qui n'existait pas jusqu'à présent. Cette complémentarité a d'ailleurs déjà été l'occasion de collaborations, notamment avec l'équipe de Frédéric Gaymard et le travail de Christian Dubos sur la régulation transcriptionnelle de l'homéostasie du fer.

Le tournant de BPMP vers la biologie des systèmes a d'ailleurs été initié dans l'équipe d'Alain Gojon. Le projet que je développe est donc favorisé dans cet environnement, notamment dans l'interaction avec Laurence Lejay, chargée de recherche à l'INRA, qui a mis en avant depuis plusieurs années ces approches dans ses projets de recherche. Il existe d'autres synergies dans l'équipe avec mon projet, notamment avec celui mené par Liên Bach, Maître de conférence à l'UM, sur l'étude fonctionnelle de la régulation post-transcriptionnelle de transporteurs de nitrate. Il faut aussi noter que l'équipe bénéficie d'un soutien privilégié en bioinformatique avec la présence de Cécile Fizames, ingénieur d'étude à l'INRA, et d'un soutien privilégié en analyses physiologiques avec la présence de Pascal Tillard, ingénieur de recherche à l'INRA.

La région de Montpellier propose un environnement riche pour ce qui concerne la biologie végétale, avec une dizaine d'unités de recherche dédiées à la recherche en biologie végétale intégrative. L'environnement local est également très riche dans le domaine de l'épigénétique et de la chromatine, avec la présence d'unités de recherche extrêmement réputées comme l'Institut de Génétique Humaine, ou l'Institut de Génomique Fonctionnelle.

En terme d'enseignement, je participe à 2 formations universitaires qui correspondent à mon projet. Je contribue au module "Epigénétique" du Master 2 Biologie Fonctionnelle des Plantes de l'UM, et au module "Grandes Fonctions Métaboliques" du Master 1 Biologie Fonctionnelle des Plantes de l'UM.

La réalisation de ce projet global dépend en partie des moyens humains et financiers qui y sont consacrés. L'axe du projet sur la régulation chromatinienne de la réponse au NO_3^- est financé par un projet ANR jusqu'en 2018, dans le cadre d'une collaboration avec les équipes d'Anne Krapp et Christian Meyer à l'IJPB, François Roudier à l'IBENS, et Benoit Lacombe à BPMP. Une collaboration avec l'équipe d'Anna Amtmann de l'Université de Glasgow a également été initiée dans le cadre du projet sur les H3K27 déméthylases, et des demandes de financement dédiées seront menées dès que possible. Un projet de thèse sur ce projet sera proposé à l'ED GAIA de l'UM pour la rentrée 2017/2018. Le projet de biologie des systèmes dans le contexte du changement climatique fait actuellement l'objet de 3 demandes de financement, à l'ANR, au labex Agro, et au département BAP de l'INRA.

Localement, ce projet est mené en étroite collaboration avec Christian Dubos de l'équipe de Frédéric Gaymard à BPMP. Considérant qu'une partie importante de ce projet fait appel à de l'intégration de données et de la biologie computationnelle, une collaboration précieuse a également été développée avec des statisticiens du génome de l'équipe de Marie-Laure Martin-Magniette d'AgroParisTech.

5. Conclusion

Les travaux de recherches que j'ai mené ont contribué à démontrer l'importance des variations chromatinienne dans la variation phénotypique chez les plantes, et à décrire les mécanismes qui y sont associés. Une partie de ces travaux, menée à BPMP, a mis en évidence un rôle original de la dynamique chromatinienne dans la régulation de la réponse aux variations nutritionnelles. Le projet global que je souhaite développer s'inscrit dans la continuité de ces travaux. Il est articulé de sorte à combiner un axe de recherche déjà productif et sans contrainte de faisabilité, à un projet plus exploratoire et plus risqué. En terme d'encadrement, une partie de ce projet sera consacrée à la formation de jeunes chercheurs. Une des principales identités que je souhaite apporter à ce projet dans son ensemble est la multiplicité des approches et des échelles ; ce projet combine signalisation et régulation chromatinienne, approches ciblées et génomiques, fonctionnelles et descriptives, dans des contextes environnementaux qui me semblent pertinents (carence nutritionnelle et changement climatique). Ces différentes approches, notamment ciblées ou génomiques, ont pour objectif d'être intégrées les unes avec les autres, et de s'enrichir mutuellement. C'est une démarche au cœur du projet de l'équipe 'Intégration des signalisations nutritionnelles', qui considère que les régulations autour de l'adaptation aux variations nutritionnelles sont multiples, et qu'il faut les intégrer pour mieux les comprendre.

6. Références

- Ainsworth EA, Long SP.** 2005. What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. *New Phytol* **165**, 351-371.
- Baerenfaller K, Grossmann J, Grobei MA, Hull R, Hirsch-Hoffmann M, Yalovsky S, Zimmermann P, Grossniklaus U, Gruissem W, Baginsky S.** 2008. Genome-scale proteomics reveals *Arabidopsis thaliana* gene models and proteome dynamics. *Science* **320**, 938-941.
- Bell O, Tiwari VK, Thomä NH, Schübeler D.** 2011. Determinants and dynamics of genome accessibility. *Nat Rev Genet* **12**, 554-564.
- Bouguyon E, Perrine-Walker F, Pervent M, Rochette J, Cuesta C, Benkova E, Martiniere A, Bach L, Krouk G, Gojon A, Nacry P.** 2016. Nitrate Controls Root Development through Posttranscriptional Regulation of the NRT1.1/NPF6.3 Transporter/Sensor. *Plant Physiol* **172**, 1237-1248.
- Buenrostro JD, Giresi PG, Zaba LC, Chang HY, Greenleaf WJ.** 2013. Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nat Methods* **10**, 1213-1218.
- Chen S, Ma J, Wu F, Xiong L-j, Ma H, Xu W, Lv R, Li X, Villen J, Gygi SP, Liu XS, Shi Y.** 2012. The histone H3 Lys 27 demethylase JMJD3 regulates gene expression by impacting transcriptional elongation. *Genes & Development* **26**, 1364-1375.
- Crevillen P, Yang H, Cui X, Greeff C, Trick M, Qiu Q, Cao X, Dean C.** 2014. Epigenetic reprogramming that prevents transgenerational inheritance of the vernalized state. *Nature* **515**, 587-590.
- Cubas P, Vincent C, Coen E.** 1999. An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. *Nature* **401**, 157-161.
- De Lucas M, Brady SM.** 2013. Gene regulatory networks in the *Arabidopsis* root. *Curr Opin Plant Biol* **16**, 50-55.
- Doidy J, Li Y, Neymotin B, Edwards MB, Varala K, Gresham D, Coruzzi GM.** 2016. "Hit-and-Run" transcription: de novo transcription initiated by a transient bZIP1 "hit" persists after the "run". *BMC Genomics* **17**, 92.
- Dolken L, Ruzsics Z, Radle B, Friedel CC, Zimmer R, Mages J, Hoffmann R, Dickinson P, Forster T, Ghazal P, Koszinowski UH.** 2008. High-resolution gene expression profiling for simultaneous kinetic parameter analysis of RNA synthesis and decay. *RNA* **14**, 1959-1972.
- Fan H, Zhang Z, Wang N, Cui Y, Sun H, Liu Y, Wu H, Zheng S, Bao S, Ling HQ.** 2014. SKB1/PRMT5-mediated histone H4R3 dimethylation of Ib subgroup bHLH genes negatively regulates iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **77**, 209-221.
- Fultz D, Choudury SG, Slotkin RK.** 2015. Silencing of active transposable elements in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **27**, 67-76.
- Gan ES, Xu Y, Wong JY, Goh JG, Sun B, Wee WY, Huang J, Ito T.** 2014. Jumonji demethylases moderate precocious flowering at elevated temperature via regulation of FLC in *Arabidopsis*. *Nat Commun* **5**, 5098.
- Gilly A, Etcheverry M, Madoui MA, Guy J, Quadrana L, Alberti A, Martin A, Heitkam T, Engelen S, Labadie K, Le Pen J, Wincker P, Colot V, Aury JM.** 2014. TE-Tracker: systematic

identification of transposition events through whole-genome resequencing. *BMC Bioinformatics* **15**, 377.

Grimanelli D, Roudier F. 2013. Epigenetics and development in plants: green light to convergent innovations. *Curr Top Dev Biol* **104**, 189-222.

Gy I, Gascioli V, Lauressergues D, Morel JB, Gombert J, Proux F, Proux C, Vaucheret H, Mallory AC. 2007. Arabidopsis FIERY1, XRN2, and XRN3 are endogenous RNA silencing suppressors. *Plant Cell* **19**, 3451-3461.

Hou X, Zhou J, Liu C, Liu L, Shen L, Yu H. 2014. Nuclear factor Y-mediated H3K27me3 demethylation of the SOC1 locus orchestrates flowering responses of Arabidopsis. *Nat Commun* **5**, 4601.

Johannes F, Colot V, Jansen RC. 2008. Epigenome dynamics: a quantitative genetics perspective. *Nat Rev Genet* **9**, 883-890.

Johannes F, Porcher E, Teixeira FK, Saliba-Colombani V, Simon M, Agier N, Bulski A, Albuissou J, Heredia F, Audigier P, Bouchez D, Dillmann C, Guerche P, Hospital F, Colot V. 2009. Assessing the impact of transgenerational epigenetic variation on complex traits. *PLoS Genet* **5**, e1000530.

Kiba T, Krapp A. 2016. Plant Nitrogen Acquisition Under Low Availability: Regulation of Uptake and Root Architecture. *Plant Cell Physiol* **57**, 707-714.

Lejay L, Gansel X, Cerezo M, Tillard P, Muller C, Krapp A, von Wiren N, Daniel-Vedele F, Gojon A. 2003. Regulation of root ion transporters by photosynthesis: functional importance and relation with hexokinase. *Plant Cell* **15**, 2218-2232.

Lezhneva L, Kiba T, Feria-Bourrellier AB, Lafouge F, Boutet-Mercey S, Zoufan P, Sakakibara H, Daniel-Vedele F, Krapp A. 2014. The Arabidopsis nitrate transporter NRT2.5 plays a role in nitrate acquisition and remobilization in nitrogen-starved plants. *Plant J* **80**, 230-241.

Loladze I. 2014. Hidden shift of the ionome of plants exposed to elevated CO₂ depletes minerals at the base of human nutrition. *Elife* **3**, e02245.

Long SP, Ainsworth EA, Leakey AD, Nosberger J, Ort DR. 2006. Food for thought: lower-than-expected crop yield stimulation with rising CO₂ concentrations. *Science* **312**, 1918-1921.

Lu F, Cui X, Zhang S, Jenuwein T, Cao X. 2011. Arabidopsis REF6 is a histone H3 lysine 27 demethylase. *Nat Genet* **43**, 715-719.

Manning K, Tor M, Poole M, Hong Y, Thompson AJ, King GJ, Giovannoni JJ, Seymour GB. 2006. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nat Genet* **38**, 948-952.

Mari-Ordonez A, Marchais A, Etcheverry M, Martin A, Colot V, Voinnet O. 2013. Reconstructing de novo silencing of an active plant retrotransposon. *Nat Genet* **45**, 1029-1039.

Marques-Bueno MM, Morao AK, Cayrel A, Platre MP, Barberon M, Caillieux E, Colot V, Jaillais Y, Roudier F, Vert G. 2016. A versatile Multisite Gateway-compatible promoter and transgenic line collection for cell type-specific functional genomics in Arabidopsis. *Plant J* **85**, 320-333.

- Martin A, Adam H, Diaz-Mendoza M, Zurczak M, Gonzalez-Schain ND, Suarez-Lopez P.** 2009a. Graft-transmissible induction of potato tuberization by the microRNA miR172. *Development* **136**, 2873-2881.
- Martin A, Belastegui-Macadam X, Quillere I, Floriot M, Valadier MH, Pommel B, Andrieu B, Donnison I, Hirel B.** 2005. Nitrogen management and senescence in two maize hybrids differing in the persistence of leaf greenness: agronomic, physiological and molecular aspects. *New Phytol* **167**, 483-492.
- Martin A, Bendahmane A.** 2010. A blessing in disguise: Transposable elements are more than parasites. *Epigenetics* **5**, 378-380.
- Martin A, Lee J, Kichey T, Gerentes D, Zivy M, Tatout C, Dubois F, Balliau T, Valot B, Davanture M, Terce-Laforgue T, Quillere I, Coque M, Gallais A, Gonzalez-Moro MB, Bethencourt L, Habash DZ, Lea PJ, Charcosset A, Perez P, Murigneux A, Sakakibara H, Edwards KJ, Hirel B.** 2006. Two cytosolic glutamine synthetase isoforms of maize are specifically involved in the control of grain production. *Plant Cell* **18**, 3252-3274.
- Martin A, Troadec C, Boualem A, Rajab M, Fernandez R, Morin H, Pitrat M, Dogimont C, Bendahmane A.** 2009b. A transposon-induced epigenetic change leads to sex determination in melon. *Nature* **461**, 1135-1138.
- Menz J, Li Z, Schulze WX, Ludewig U.** 2016. Early nitrogen-deprivation responses in Arabidopsis roots reveal distinct differences on transcriptome and (phospho-) proteome levels between nitrate and ammonium nutrition. *Plant J.*
- Miura K, Agetsuma M, Kitano H, Yoshimura A, Matsuoka M, Jacobsen SE, Ashikari M.** 2009. A metastable DWARF1 epigenetic mutant affecting plant stature in rice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 11218-11223.
- Mozgova I, Hennig L.** 2015. The polycomb group protein regulatory network. *Annu Rev Plant Biol* **66**, 269-296.
- Myers SS, Zanobetti A, Kloog I, Huybers P, Leakey AD, Bloom AJ, Carlisle E, Dietterich LH, Fitzgerald G, Hasegawa T, Holbrook NM, Nelson RL, Ottman MJ, Raboy V, Sakai H, Sartor KA, Schwartz J, Seneweera S, Tausz M, Usui Y.** 2014. Increasing CO₂ threatens human nutrition. *Nature* **510**, 139-142.
- Nesvizhskii AI.** 2014. Proteogenomics: concepts, applications and computational strategies. *Nat Methods* **11**, 1114-1125.
- O'Malley RC, Huang SS, Song L, Lewsey MG, Bartlett A, Nery JR, Galli M, Gallavotti A, Ecker JR.** 2016. Cistrome and Epicistrome Features Shape the Regulatory DNA Landscape. *Cell* **165**, 1280-1292.
- Petricka JJ, Schauer MA, Megraw M, Breakfield NW, Thompson JW, Georgiev S, Soderblom EJ, Ohler U, Moseley MA, Grossniklaus U, Benfey PN.** 2012. The protein expression landscape of the Arabidopsis root. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 6811-6818.
- Rabani M, Levin JZ, Fan L, Adiconis X, Raychowdhury R, Garber M, Gnirke A, Nusbaum C, Hacohen N, Friedman N, Amit I, Regev A.** 2011. Metabolic labeling of RNA uncovers principles of RNA production and degradation dynamics in mammalian cells. *Nat Biotechnol* **29**, 436-442.
- Roudier F, Ahmed I, Berard C, Sarazin A, Mary-Huard T, Cortijo S, Bouyer D, Caillieux E, Duvernois-Berthet E, Al-Shikhley L, Giraut L, Despres B, Drevensek S, Barneche F, Derozier**

- S, Brunaud V, Aubourg S, Schnittger A, Bowler C, Martin-Magniette M-L, Robin S, Caboche M, Colot V.** 2011. Integrative epigenomic mapping defines four main chromatin states in Arabidopsis. *EMBO J* **30**, 1928-1938.
- Sani E, Herzyk P, Perrella G, Colot V, Amtmann A.** 2013. Hyperosmotic priming of Arabidopsis seedlings establishes a long-term somatic memory accompanied by specific changes of the epigenome. *Genome Biol* **14**, R59.
- Schwab B, Michel M, Zacher B, Frühauf K, Demel C, Tresch A, Gagneur J, Cramer P.** 2016. TT-seq maps the human transient transcriptome. *Science* **352**, 1225.
- Schwartz YB, Pirrotta V.** 2007. Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nat Rev Genet* **8**, 9-22.
- Secco D, Wang C, Shou H, Schultz MD, Chiarenza S, Nussaume L, Ecker JR, Whelan J, Lister R.** 2015. Stress induced gene expression drives transient DNA methylation changes at adjacent repetitive elements. *Elife* **4**.
- Sidaway-Lee K, Costa MJ, Rand DA, Finkenstadt B, Penfield S.** 2014. Direct measurement of transcription rates reveals multiple mechanisms for configuration of the Arabidopsis ambient temperature response. *Genome Biol* **15**, R45.
- Silveira AB, Trontin C, Cortijo S, Barau J, Del Bem LE, Loudet O, Colot V, Vincentz M.** 2013. Extensive natural epigenetic variation at a de novo originated gene. *PLoS Genet* **9**, e1003437.
- Smith AP, Jain A, Deal RB, Nagarajan VK, Poling MD, Raghothama KG, Meagher RB.** 2010. Histone H2A.Z regulates the expression of several classes of phosphate starvation response genes but not as a transcriptional activator. *Plant Physiol* **152**, 217-225.
- Soussana JF, Teyssonneyre F, Picon-Cochard C, Dawson L.** 2005. A trade-off between nitrogen uptake and use increases responsiveness to elevated CO₂ in infrequently cut mixed C3 grasses. *New Phytol* **166**, 217-230.
- Tanurdzic M, Banks JA.** 2004. Sex-determining mechanisms in land plants. *Plant Cell* **16 Suppl**, S61-71.
- Taub DR, Wang X.** 2008. Why are nitrogen concentrations in plant tissues lower under elevated CO₂? A critical examination of the hypotheses. *J Integr Plant Biol* **50**, 1365-1374.
- Taylor-Teeples M, Lin L, de Lucas M, Turco G, Toal TW, Gaudinier A, Young NF, Trabucco GM, Veling MT, Lamothe R, Handakumbura PP, Xiong G, Wang C, Corwin J, Tsoukalas A, Zhang L, Ware D, Pauly M, Kliebenstein DJ, Dehesh K, Tagkopoulos I, Breton G, Prunedapaz JL, Ahnert SE, Kay SA, Hazen SP, Brady SM.** 2015. An Arabidopsis gene regulatory network for secondary cell wall synthesis. *Nature* **517**, 571-575.
- Tian C, Zhang X, He J, Yu H, Wang Y, Shi B, Han Y, Wang G, Feng X, Zhang C, Wang J, Qi J, Yu R, Jiao Y.** 2014. An organ boundary-enriched gene regulatory network uncovers regulatory hierarchies underlying axillary meristem initiation. *Mol Syst Biol* **10**, 755.
- Wang Y, Jiang R, Wong WH.** 2016. Modeling the causal regulatory network by integrating chromatin accessibility and transcriptome data. *National Science Review*.
- Wibowo A, Becker C, Marconi G, Durr J, Price J, Hagemann J, Papareddy R, Putra H, Kageyama J, Becker J, Weigel D, Gutierrez-Marcos J.** 2016. Hyperosmotic stress memory in Arabidopsis is mediated by distinct epigenetically labile sites in the genome and is restricted in the male germline by DNA glycosylase activity. *Elife* **5**.

Widiez T, El Kafafi ES, Girin T, Berr A, Ruffel S, Krouk G, Vayssieres A, Shen W-H, Coruzzi GM, Gojon A, Lepetit M. 2011. HIGH NITROGEN INSENSITIVE 9 (HNI9)-mediated systemic repression of root NO₃⁻ uptake is associated with changes in histone methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 13329-13334.

Zhang J, Boualem A, Bendahmane A, Ming R. 2014. Genomics of sex determination. *Curr Opin Plant Biol* **18**, 110-116.

Zhao M, Ding H, Zhu JK, Zhang F, Li WX. 2011. Involvement of miR169 in the nitrogen-starvation responses in Arabidopsis. *New Phytol* **190**, 906-915.