

RELEVÉ DE LA LITTÉRATURE

Les bases physiologiques de la réponse florale à la vernalisation

La vernalisation est définie comme étant « l'acquisition ou l'accélération de la compétence à fleurir suite à un traitement au froid » (Chouard, 1960).

Historique

Les premières expériences concernant l'effet des basses températures sur la floraison ont été réalisées par Klippart dès 1857 et Gassner en 1918 sur des céréales d'hiver. Il ressort de ces travaux que, parmi les différents facteurs climatiques rencontrés en saison hivernale, ce sont les basses températures auxquelles sont exposées les plantules durant plusieurs semaines qui jouent un rôle déterminant : elles rendent les céréales capables de fleurir dès que les températures redeviennent favorables à la croissance et que la durée des jours s'allonge, c'est-à-dire dès le retour du printemps. En référence aux céréales de printemps qui sont appelées 'Jarovoe' en Russe, Lyssenko (1928) utilisa le mot 'Jarovisation' pour nommer le phénomène par lequel des céréales d'hiver - après exposition au froid - se comportent comme des céréales de printemps. Ce terme a été traduit en Français et en Anglais par 'vernalisation' (provenant de 'vernum' c'est-à-dire 'printemps' en Latin). Certains auteurs français parlent aussi de 'printanisation' (Murneek and Whyte, 1948 ; Chouard, 1960).

Depuis, la vernalisation a été étudiée chez un grand nombre d'espèces aussi diverses que le seigle d'hiver Petkus (*Secale cereale*), l'ivraie vivace (*Lolium perenne*), l'endive (*Cichorium endiva*), le céleri (*Apium graveolens*), le pois (*Pisum sativum*), le

chou (*Brassica oleracea*), le colza (*Brassica napus*), la jusquiame noire (*Hyoscyamus niger*), la digitale pourpre (*Digitalis purpurea*) (pour revues : Chouard, 1960 ; Bernier *et al.*, 1981a). Parmi ces espèces, on distingue celles dont le besoin de vernalisation est absolu (ou qualitatif) et celles dont le besoin est facultatif (ou quantitatif). D'une manière simple, ce besoin est absolu chez les bisannuelles et pérennes alors qu'il est facultatif chez les annuelles d'hiver, mais des exceptions sont connues. Les plantes à besoin facultatif peuvent être vernalisées au stade graine imbibée tandis que celles dont le besoin est absolu doivent atteindre un âge critique ou un certain stade de développement pour pouvoir répondre à la vernalisation (Friend, 1985).

Caractéristiques générales

1) La perception de la vernalisation

Des expériences de greffe ont montré que seule la partie apicale doit être exposée au froid pour qu'il y ait vernalisation, ce qui suggère que le site de perception de la vernalisation est le méristème caulinaire. Cependant, la régénération de plantes à partir de tissus somatiques a permis de découvrir que des cellules en dehors du SAM peuvent aussi répondre à la vernalisation (Wellensiek, 1962, 1964 ; Metzger, 1988). Chez certaines espèces, des fragments de feuilles en croissance au moment du froid sont capables de régénérer *in vitro* des plantes florales. Dans ce cas, la vernalisation n'a lieu que si des cellules en division sont présentes dans les tissus exposés aux basses températures (Wellensiek, 1964). Cependant chez d'autres espèces comme, par exemple, *Thlaspi arvense*, même les feuilles totalement développées de plantes vernalisées peuvent former des fleurs *in vitro* (Metzger, 1988). On peut conclure de ces expériences que, d'une part, des cellules autres que celles de l'apex peuvent être vernalisées et que, d'autre part, le fait que la vernalisation requiert la présence de divisions cellulaires est spécifique à certaines espèces.

2) La température et la durée du traitement vernalisant

La gamme de température, la durée de l'exposition au froid et le stade de développement au moment de l'exposition qui permettent une vernalisation efficace varient entre espèces, voire entre variétés. Le tableau II.1 reprend quelques exemples de conditions de vernalisation utilisées chez différentes espèces de la famille des Brassicaceae.

Les températures efficaces sont généralement comprises entre 1 et 7°C. Certaines espèces peuvent être vernalisées à des températures en dessous de 0°C tandis que, dans les régions chaudes, d'autres peuvent avoir un optimum jusqu'à 13°C.

Typiquement, une durée de 1 à 3 mois de froid est nécessaire pour promouvoir la floraison. Chez les espèces qui requièrent peu de vernalisation, quelques jours peuvent être suffisants, alors que d'autres espèces requièrent plusieurs mois de froid pour pouvoir fleurir ultérieurement.

La réponse à la vernalisation est de **nature quantitative** : plus l'exposition aux basses températures est longue, plus la floraison est accélérée. Cette réponse atteint ensuite un point de saturation et ce, quelle que soit la gamme des températures vernalisantes (Lang, 1965).

Tableau II.1 Exemples de conditions de vernalisation utilisées chez des espèces de la famille des Brassicaceae.

Espèce	Durée Température	Stade d'application	Références
<i>Brassica oleracea</i>	<i>cv. Capitata</i> 6 à 8 semaines 5°C	Plante (7 à 9 feuilles)	Friend, 1985 Lin <i>et al.</i> , 2005
<i>cv. Gongylodes</i>	5 semaines 2 à 8°C	Plante (5 feuilles)	Wiebe <i>et al.</i> , 1992
<i>Brassica napus</i>	<i>cv. Crystal</i> min. 8 semaines 4°C	Plante (4 semaines)	Zanewich and Rood, 1995
<i>cv. Annuua</i>	6 semaines 4°C	Graine imbibée	Dahanayake and Galwey, 1998
<i>Brassica juncea</i>	max. 6 semaines /	Graine imbibée	Sen and Chakravarti, 1946

<i>Cheiranthus allionii</i>	/ /	Graine imbibée, plantule et plante	Barendse, 1964
<i>Barbarea verna</i>	5 semaines 4°C	Plante (min. 5 semaines)	Tague <i>et al.</i> , 2004
<i>Raphanus sativus</i>	6 à 8 jours 6°C	Graine imbibée	Erwin <i>et al.</i> , 2002

3) La mémoire épigénétique de la vernalisation

Telle que décrite par Chouard (1960), la vernalisation n'induit pas directement l'initiation de primordiums de fleurs : elle rend la plante capable de fleurir lors du retour des températures printanières. En effet, il peut exister une séparation temporelle, parfois de plusieurs mois, entre la période où les plantes sont exposées au froid hivernal et la phase de développement floral. Entre ces deux périodes, les plantes gardent en mémoire l'induction perçue. Cependant, il ne s'agit pas d'une règle absolue : chez certaines espèces, les structures florales peuvent déjà s'initier durant la période de froid, comme chez *Cheiranthus allionii* (Barendse, 1964).

Le traitement au froid génère un état vernalisé qui est transmis au travers des divisions mitotiques successives durant le développement végétatif. Cependant, cet état vernalisé n'est pas transmis au zygote. Ainsi, le besoin de vernalisation est restauré à la génération suivante. La transmission d'un caractère via la mitose et non la méiose est caractéristique d'une **régulation épigénétique**.

4) La dévernalisation

La vernalisation est un **processus réversible**. L'effet d'un traitement au froid peut en effet être atténué, voire annulé, par des hautes températures appliquées durant quelques jours. Ce processus est appelé la 'dévernalisation'. Les températures dévernalisantes sont habituellement comprises entre 25 et 40°C. Le traitement à hautes températures doit répondre à deux conditions pour être efficace: 1) il doit suivre une période de vernalisation sous-optimale ; 2) il doit être donné immédiatement après cette période de vernalisation (Lang, 1965). Enfin, des graines ou des plantes dévernalisées

peuvent être ‘revernalisées’ par une période de froid supplémentaire, montrant ainsi la réversibilité des deux mécanismes.

5) Interaction de la vernalisation avec d’autres facteurs de l’environnement

De nombreuses études ont montré que l’effet du froid peut être influencé par d’autres facteurs environnementaux tels que la photopériode ou l’intensité lumineuse (Chouard, 1960 ; Napp-Zinn, 1973 ; Bernier *et al.*, 1981 a/b).

En ce qui concerne la photopériode, certaines plantes, qui requièrent une période de froid vernalisant, nécessitent également des JLs pour pouvoir fleurir. Il s’agit par exemple de la jusquiame noire (*Hyoscyamus niger*), de la campanule à grosses fleurs (*Campanula medium*), de l’onagre bisannuel (*Oenothera biennis*) et de la carotte (*Daucus carota*). D’autres espèces dont la floraison nécessite des JLs peuvent par contre fleurir en JC si elles sont préalablement vernalisées. Cependant, la floraison de ces plantes est plus précoce si les basses températures sont combinées aux JLs plutôt qu’aux JCs. C’est le cas de différentes espèces de betterave (genre *Beta*), de la digitale pourpre (*Digitalis purpurea*) et d’*A. thaliana*.

La vernalisation chez *Sinapis alba*

Chez *S. alba*, l’effet promoteur de la vernalisation sur le moment de floraison a été démontré par plusieurs équipes : Harder and Störmer (1936) et von Denffer (1939) en Allemagne, et David (1942) en France (Revu dans Murneek and Whyte, 1948 ; Bernier, 1969). Tous ces auteurs ont observé que la vernalisation de graines de moutarde blanche accélère de façon significative la floraison. La durée de vernalisation saturante est de 50 jours selon von Denffer (1939). La vernalisation de graines imbibées (4 semaines à 2°C) ou de plantes âgées d’un mois (4 semaines à 5°C) augmente la réponse florale de *S. alba* à des JLs (Bernier, 1969 ; Bodson, 1985).

La vernalisation chez *Arabidopsis thaliana*

L'espèce *A. thaliana* est la plante modèle la plus utilisée par les scientifiques pour étudier les gènes impliqués dans la transition florale, et notamment dans la réponse à la vernalisation. Cependant, les aspects physiologiques sont moins étudiés. Les premières études sur le sujet ont permis de classer les différents écotypes d'*A. thaliana* en deux catégories : les annuelles d'été et les annuelles d'hiver (revu dans Laibach, 1951 ; Napp-Zinn, 1969). La première catégorie comprend les écotypes à floraison précoce qui sont peu ou moyennement sensibles à la vernalisation tandis que la seconde catégorie regroupe les écotypes à floraison tardive qui présentent une forte réponse florale aux basses températures. La majorité des expériences menées avec *A. thaliana* utilisent des écotypes d'été car certains ont l'avantage d'avoir un cycle de vie très court ; il s'agit principalement des écotypes Col et Ler.

Tous les écotypes d'*A. thaliana* sont sensibles au froid principalement au stade graine imbibée (Napp-Zinn, 1969). Certains écotypes peuvent aussi répondre à la vernalisation au stade rosette, mais le traitement au froid est moins efficace (Nordborg and Bergelson, 1999). Chez l'écotype d'hiver Stockholm, la floraison est accélérée par une période de froid (4°C) appliquée au stade graine imbibée pendant 1 à 4 semaines (Chintraruck and Ketellapper, 1969). Dans ces conditions, il est possible de réverser l'effet positif de la vernalisation en exposant les graines à une température de 32°C, pendant une semaine. Au-delà d'une durée de 5 à 6 semaines de vernalisation, la réponse florale est saturée et la dévernalisation n'est plus possible.

L'effet d'une combinaison d'un traitement vernalisant et d'une exposition aux JLS a été étudié également chez l'écotype d'hiver Stockholm. Il a été observé que l'influence de la vernalisation sur la sensibilité aux JLS varie suivant la longueur du traitement vernalisant. En effet, une période de vernalisation partielle (1 à 4 semaines) accroît la sensibilité photopériodique tandis qu'une période de froid saturante (5 à 6 semaines) rend la plante indifférente à tout traitement photopériodique ultérieur (Chintraruck and

Ketellapper, 1969).

Chez l'écotype Col, l'influence de la vernalisation sur la sensibilité aux JLs pourrait dépendre des conditions de culture. Ainsi, des plantes cultivées sur terreau nécessitent un traitement vernalisant de minimum deux semaines pour pouvoir répondre complètement à l'induction par un seul JL de 22h à l'âge de 8 semaines, c'est-à-dire pour que toutes les plantes de la population soumise au traitement photoinducteur soient florales (Corbesier *et al.*, 1996). Cependant, la vernalisation des plantes n'est plus nécessaire lorsque celles-ci sont cultivées sur un milieu hydroponique : après 7 semaines de croissance, une floraison complète est obtenue après un JL inducteur de 16h (Tocquin *et al.*, 2003).

Les bases moléculaires de la réponse florale à la vernalisation

La plante 'modèle' *Arabidopsis thaliana*

La majorité des recherches concernant les gènes impliqués dans la réponse à la vernalisation ont été réalisées chez *A. thaliana*. Ces recherches ont abouti à l'identification de plusieurs voies de réponse à la vernalisation (Figure II.1) dont la principale est dépendante du gène *FLOWERING LOCUS C (FLC)*.

1) La voie de la vernalisation dépendante de *FLC*

FLC, aussi appelé *FLF (FLOWERING LOCUS F)* code pour un facteur de transcription à boîte MADS, inhibiteur de la floraison (Michaels and Amasino, 1999 ; Sheldon *et al.*, 1999). *FLC* est principalement exprimé dans les apex végétatifs et dans les racines, mais il est aussi détectable dans les feuilles et les tiges (Michaels and Amasino, 1999). Comme nous l'avons indiqué dans l'introduction, *FLC* est réprimé par deux voies de promotion de la floraison : la voie autonome et la voie de la vernalisation.

Figure II.1. Modèle des voies génétiques impliquées dans le contrôle de la floraison en réponse à la

vernalisation chez *A. thaliana*.

La vernalisation inhibe la transcription de *FLC* (Figure II.1), ce qui explique que la vernalisation rend la voie autonome inutile (revu dans Michaels and Amasino, 2000). Les observations physiologiques de la réponse à la vernalisation réalisées antérieurement peuvent s'expliquer par l'analyse de l'expression de *FLC* :

- ❑ L'ampleur de la diminution du niveau de transcription de *FLC* par la vernalisation est proportionnelle à la durée du traitement au froid et est directement corrélée au moment de floraison (réponse quantitative).
- ❑ Cette répression, présente dans tous les tissus, est stable au travers des divisions mitotiques mais une haute activité de *FLC* est restaurée à chaque nouvelle génération, après passage par le stade de la méiose ; la régulation est donc bien épigénétique.

1.1) Les mécanismes de répression de FLC par la vernalisation

La répression épigénétique de gènes implique des modifications au niveau de l'ADN et des histones (Berger and Gaudin, 2003). Les premières hypothèses émises ont suggéré que la vernalisation jouait sur le degré de méthylation des résidus cytosine de l'ADN (Burn *et al.*, 1993). Une floraison précoce est en effet obtenue en traitant des plantes par un agent

déméthylant (la 5-azacytidine), ou encore chez des plantes transgéniques chez lesquelles la méthylation des résidus cytosine est diminuée par l'expression antisens de la *METHYLTRANSFERASE (MET)* (Finnegan *et al.*, 1998). Chez ces deux types de plantes, le niveau d'expression de *FLC* est réduit par rapport à celui de plantes témoins (Sheldon *et al.*, 1999). Mais on sait aujourd'hui que la répression de *FLC*, observée chez des plantes possédant un faible niveau d'ADN méthylé, est provoquée par un mécanisme distinct de celui exercé par la vernalisation (Finnegan *et al.*, 2005).

Des études récentes ont montré qu'au cours de la vernalisation, les histones proches du gène *FLC* subissent des modifications (Bastow *et al.*, 2004 ; Sung and Amasino, 2004b ; Sung and Amasino, 2006 ; Sung *et al.*, 2006) : la vernalisation induit une augmentation du niveau de déacétylation des résidus lysine 9 et 14 de l'histone H3

(H3K9 et H3K14) dans la région 5' de *FLC*, une augmentation de la méthylation des résidus lysine 9 et 27 (H3K9 et H3K27) et une réduction de la méthylation des résidus lysine 4 (H3K4) de la même histone. Ces modifications sont typiquement associées à une répression génique (Bastow *et al.*, 2004 ; Sung and Amasino, 2004b ; Sung *et al.*, 2006) et sont utilisées comme 'marqueurs chromatiniens' de la répression de *FLC*.

L'étude de mutants affectés dans la sensibilité à la vernalisation a permis d'isoler des gènes responsables de ces modifications. Le premier gène qui intervient est *VERNALIZATION INSENSITIVE 3 (VIN3)* ; il code pour une protéine contenant deux domaines : un domaine PHD (plant homeodomain), qui est souvent trouvé chez des protéines appartenant aux complexes de remodelage de la chromatine et un domaine FNIII (fibronectin type III), impliqué dans l'interaction protéine-protéine. La protéine VIN3 est nécessaire à la déacétylation des résidus H3K9 (Sung and Amasino, 2004a) et forme un complexe protéique avec une protéine homologue : *VERNALIZATION 5* (Greb *et al.*, 2007). Le mutant *vin3* est insensible à la vernalisation ; il ne présente pas de modification des histones et donc pas de répression de l'expression de *FLC*. La fonction du gène *VIN3* est donc **l'initiation de la répression de *FLC***. Le deuxième groupe de gènes comprend *VERNALIZATION 1 (VRN1)* et *VERNALIZATION 2 (VRN2)* (Gendall *et al.*, 2001 ; Levy *et al.*, 2002). Les mutants *vrn1* et *vrn2* diffèrent de *vin3* par le fait que la répression initiale de *FLC* par le froid se produit correctement mais quand *vrn1* et *vrn2* retournent à température ambiante, la répression de *FLC* n'est pas maintenue. VRN1 et VRN2 jouent donc un rôle dans **le maintien d'une répression stable de *FLC***. *VRN1* code pour une protéine de liaison à l'ADN contenant un domaine B3 et est nécessaire à la méthylation des résidus H3K9. La protéine VRN2 ressemble à une protéine de *Drosophila melanogaster* - Suppressor of Zeste 12 (Su(z)12) - qui contrôle la structure chromatinienne à proximité de certains gènes durant l'embryogenèse et la prolifération cellulaire. Chez les animaux, Su(z)12 est une protéine faisant partie d'un complexe de répression, appelé complexe de répression Polycomb 2 (PRC2), agissant par méthylation des résidus H3K27 des gènes cibles. Su(z)12 interagit dans le complexe PRC2 avec Enhancer of zeste (E(z)) et Extra Sex Combs (ESC) (Müller *et al.*, 2002). Chez *A.*

thaliana, VRN2 semble avoir le même rôle que Su(z)12 dans la répression de *FLC* ; chez le mutant *vrn2*, le niveau de méthylation des H3K27 et des H3K9 n'augmente pas durant le froid. Plusieurs équipes ont montré que VRN2 interagit avec des protéines homologues de E(z) et de ESC (Chanvivattana *et al.*, 2004 ; Wood *et al.*, 2006). VRN2 semble être nécessaire pour recruter VRN1 sur le gène *FLC*.

Signalons que ce modèle d'action séquentielle de VIN3 et VRN1/VRN2, admis depuis plusieurs années, vient d'être remis en question. Il apparaît en effet que *VRN2* pourrait agir de façon concomitante à *VIN3* au cours de l'initiation de la répression de *FLC* (Sheldon *et al.*, 2006). Cette idée est confortée par l'observation selon laquelle les protéines VIN3 et VRN2 peuvent être associées dans un même complexe protéique (Wood *et al.*, 2006).

Chez les animaux, le maintien de la répression de gènes induite par le PRC2 nécessite l'action du complexe de répression Polycomb 1 (PRC1) (Cao *et al.*, 2002). Cependant aucun homologue des composants du PRC1 n'a été identifié chez les plantes. Chez *A. thaliana*, une protéine pouvant jouer un tel rôle de maintien du PRC2 est LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 (LHP1) par homologie avec HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 (HP1) présente chez *D. melanogaster* et certains vertébrés. Chez un mutant *lhp1*, l'expression de *FLC* est réprimée durant la vernalisation mais lorsque les plantes sont de retour à température ambiante, ce niveau d'expression redevient comparable à celui présent chez des plantes non vernalisées (Mylne *et al.*, 2006 ; Sung *et al.*, 2006). Aussi, chez un mutant *lhp1* vernalisé, il y a bien augmentation de la méthylation des résidus H3K9 et diminution de la méthylation des résidus H3K4 mais ces modifications ne sont pas maintenues après la vernalisation (Sung *et al.*, 2006). *LHP1* est donc requis pour un maintien stable des marqueurs chromatiniens caractéristiques de la répression de *FLC*.

1.2) Les gènes activateurs de *FLC*

Le criblage de mutants présentant une floraison précoce et un niveau faible d'expression du gène *FLC* par rapport au type sauvage a permis d'isoler un grand nombre de gènes impliqués dans la régulation positive de l'expression de *FLC*. La majorité de ces gènes peuvent être classés dans trois grands groupes (Figure II.1):

❓ *FRIGIDA (FRI)* est le premier gène identifié comme activateur de *FLC* (Lee and Amasino, 1995 ; Sanda and Amasino, 1996). *FRI* code pour une protéine qui possède des domaines structurés en hélices super enroulées (Johanson *et al.*, 2000) mais le mécanisme par lequel elle régule l'expression de *FLC* n'est pas connu. Des variations alléliques au niveau du couple *FRI/FLC* sont responsables de la différence du moment de floraison observée parmi les nombreux écotypes d'*A. thaliana*, comme nous le verrons plus loin.

Il existe deux autres gènes chez *A. thaliana* codant pour des protéines apparentées à *FRI* : il s'agit de *FRIGIDA LIKE 1 (FRL1)* et de *FRIGIDA LIKE 2 (FRL2)* (Michaels *et al.*, 2004). Les protéines *FRL1*, *FRIGIDA-ESSENTIAL 1 (FES1)* et *AERIAL ROSETTE 1 (ART1)* contrôlèrent de manière coopérative l'expression de *FLC* (Poduska *et al.*, 2003 ; Schmitz *et al.*, 2005). Enfin, une dernière protéine, *SUPPRESSOR OF FRIGIDA 4 (SUF4)* semble également interagir avec *FRI* et *FRL1* (Kim *et al.*, 2006b). Cette protéine a également la particularité de se lier à *LUMINIDEPENDENS (LD)* (Lee *et al.*, 1994), une protéine faisant partie de la voie autonome de promotion de la floraison. En la présence de *FRI*, *SUF4* forme un complexe avec *FRI* et *FRL1* pour activer l'expression de *FLC*. En l'absence de *FRI*, la protéine *SUF4* se lie à *LD*. Cette liaison conduit à la suppression de l'activité de *SUF4* ; *FLC* est alors faiblement exprimé (Kim *et al.*, 2006b).

❓ Le second groupe comprend *EARLY FLOWERING 7 (ELF7)* (He *et al.*, 2004), *ELF8* (He *et al.*, 2004), *VERNALIZATION INDEPENDENCE 4 (VIP4)* (Zang and van Nocker, 2002) et *VIP5* (Oh *et al.*, 2004). *ELF7*, *ELF8*, *VIP4* et *VIP5* sont des protéines homologues à celles formant le complexe 'RNA polymérase II associated factor 1' (*PAF1*) chez la levure et *D. melanogaster*. Ce complexe (formé de 5 protéines) s'associe avec l'ARN polymérase II pour recruter une méthyltransférase (appelée *SET1*) sur le gène cible ; l'enzyme tri-méthyle alors le résidu H3K4. Cette tri-méthylation est un marqueur chromatinien caractéristique d'un gène actif. Le génome d'*A. thaliana* possède 39 gènes codant pour une

méthyltransférase présentant une homologie avec les protéines SET (Zhao *et al.*, 2005). Parmi celles-ci, EARLY FLOWERING IN SHORT DAYS (EFS) catalyse spécifiquement la méthylation de H3K4 et semble requise pour une expression élevée de *FLC* (Kim *et al.*, 2005a). Une situation similaire à celle observée chez *D. melanogaster* pourrait donc exister chez *A. thaliana* (Figure II.1); ELF7, ELF8, VIP4 et VIP5 recruteraient EFS pour activer *FLC* (He and Amasino, 2005 ; Sung and Amasino, 2005).

- ❑ Le troisième groupe est constitué des gènes *PHOTOPERIOD-INDEPENDENT EARLY FLOWERING 1 (PIE1)*, *ACTIN-RELATED PROTEIN 6 (ARP6)* et *SERRATED LEAVES AND EARLY FLOWERING (SEF)* (Noh and Amasino, 2003 ; Choi *et al.*, 2005 ; Deal *et al.*, 2005 ; March-Díaz *et al.*, 2006 ; Martin-Trillo *et al.*, 2006). PIE1, ARP6 et SEF sont homologues des protéines d'un complexe impliqué dans le remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP chez la levure (complexe SWR1) ; elles sont requises pour l'acétylation des histones ainsi que pour une hyperméthylation des résidus H3K4. SEF interagit physiquement avec PIE1 et ARP6 ; ces protéines formeraient un complexe semblable au complexe SWR1 (March-Díaz *et al.*, 2006). Ces protéines sont également nécessaires pour l'insertion d'une forme variante de l'histone H2A, l'histone H2A.Z (Deal *et al.*, 2007). Cette forme variante maintient la chromatine dans un état accessible pour la machinerie transcriptionnelle.
- ❑ Enfin, il existe trois autres gènes qui influencent positivement l'expression de *FLC* mais qui ne font pas partie des trois catégories d'activateurs précitées. Il s'agit de *EARLY IN SHORT DAYS 4 (ESD4)* (Reeves *et al.*, 2002), *HUA2* (Doyle *et al.*, 2005) et *MGOUN3 (MGO3)* (Guyomarc'h *et al.*, 2006). Chez le mutant *mgo3*, la région autour du codon d'initiation de la traduction de *FLC* présente un faible niveau d'acétylation de l'H3. L'activité du gène *MGO3* serait donc requise pour une acétylation 'normale' des histones du locus *FLC* (Guyomarc'h *et al.*, 2006).

1.3) Les domaines du gène *FLC* nécessaires pour sa régulation

Les différentes régions du gène *FLC* de l'écotype C24 ont fait l'objet d'une étude détaillée (Figure II.2 ; Sheldon *et al.*, 2002). La technique utilisée consiste à fusionner différentes portions du gène avec le gène rapporteur *GUS*. Le gène *FLC* comprend 7 exons et 6 introns ; cependant, une construction contenant les deux premiers exons ainsi que l'intron 1 sous le contrôle d'une portion de 2-kb en amont de l'ATG (Figure II.2.A) suffit à induire un patron d'expression de *GUS* similaire à celui du gène *FLC*. Cette portion de ± 6 kb contient donc tous les éléments utiles à la régulation de *FLC*. Des expériences de délétion de ce fragment minimal ont montré que les éléments de régulation essentiels se situent dans une région de 272 pb en amont du codon ATG ainsi que dans deux segments (2 et 7) de l'intron 1. Certaines modifications de l'histone H3 qui se déroulent durant la vernalisation (déacétylation des résidus K9/K14 et méthylation des résidus K9/K27) ont été détectées dans les régions chromatiniennes couvrant le promoteur et l'intron 1 (Bastow *et al.*, 2004 ; Sung and Amasino, 2004a ; Shindo *et al.*, 2006). Ces régions sont aussi impliquées dans l'interaction avec les protéines VIN3 et VRN1 (Sung and Amasino, 2004a).

Le promoteur de *FLC* contient également des motifs similaires à ceux impliqués dans le contrôle de l'expression des gènes par l'acide abscissique (ABA) et la lumière. Un lien entre l'ABA et *FLC* vient d'être démontré par l'intermédiaire de la protéine FCA, qui réprime *FLC* et est capable de se lier à l'ABA (Razem *et al.*, 2006). Cependant, la répression de *FLC* par FCA ne nécessite pas la séquence promotrice du segment minimal de 6 kb mais requiert la région de 4 kb en aval du codon ATG (Figure II.2.G).

Un autre lien entre *FLC* et l'ABA provient de l'observation selon laquelle une mutation dans le gène *ABHI* (*ABSCISIC ACID HYPERSENSITIVE 1*), qui code pour un modulateur de la sensibilité à l'ABA, supprime le haut niveau d'expression de *FLC* habituellement observé dans une lignée contenant *FRI* (Bezerra *et al.*, 2004). Cependant, une mutation d'un gène impliqué dans la biosynthèse ou la réponse à l'ABA a peu d'effet sur la réponse à la vernalisation (Chandler *et al.*, 2000 ; Liu *et al.*, 2002).

Le maintien de la répression de *FLC* par la vernalisation nécessite des éléments de régulation situés dans l'intron 1, initialement localisés dans une partie de 2.8 kb (Figure II.2.C), au sein de laquelle Sung *et al.* (2006) ont identifié une région de moins de 300 pb dont la délétion supprime la stabilité de la répression de *FLC*. La protéine LHP1, impliquée dans ce maintien de l'état réprimé de *FLC*, se lie à une zone de l'intron 1 qui recouvre ce fragment.

1.4) La variation naturelle du besoin de vernalisation chez les différents écotypes d'A. thaliana

La variation naturelle du besoin de vernalisation chez les différents écotypes d'*A. thaliana* est corrélée avec le contrôle de l'activité de *FLC*. Le principal facteur est génétique : des allèles dominants de *FRI* et *FLC* confèrent aux plantes le comportement d'annuelles d'hiver, qui nécessitent la vernalisation pour fleurir précocement. Au contraire, la perte de fonction de l'un et/ou l'autre de ces allèles rend compte des génotypes annuels d'été, qui fleurissent indépendamment de la vernalisation (Johanson, 2000 ; Le Corre *et al.*, 2002 ; Gazzani *et al.*, 2003 ; Michaels *et al.*, 2003a ; Michaels *et al.*, 2004 ; Shindo *et al.*, 2005 ; Werner *et al.*, 2005). Pour exemples, les écotypes Col et *Ler* ont une floraison précoce grâce à la présence d'un allèle de *FLC* dit 'faible'. *Ler* est le seul écototype connu qui possède en plus un allèle nul de *FRI*, de sorte qu'il fleurit encore plus vite que Col. Une hypothèse largement admise propose que les écotypes d'été dérivent d'écotypes d'hiver ancestraux via plusieurs événements indépendants de variations alléliques (Gazzani *et al.*, 2003 ; Michaels *et al.*, 2003a ; Koornneef *et al.*, 2004 ; Shindo *et al.*, 2005). L'apparition d'un allèle nul de *FRI* s'est probablement produite après la colonisation du nord de l'Europe par *A. thaliana* (Toomajian *et al.*, 2006) ; cette colonisation a suivi la fin de la dernière période de glaciation, il y a ± 10000 ans.

Des variations alléliques au niveau des locus *FRL1* et *FRL2* pourraient également rendre compte des différences du moment de floraison observées chez certains écotypes (Schläppi, 2006).

La variation naturelle pourrait également être liée aux mécanismes de régulation épigénétique de *FLC* pendant – et après – la vernalisation. Une étude récente montre en effet que les marques chromatiniennes caractéristiques de la répression de *FLC* s'accumulent différemment au cours de la vernalisation chez différents écotypes suédois (Shindo *et al.*, 2006). Ces différences peuvent être corrélées à la différence de sensibilité à la vernalisation de ces écotypes et pourraient être dues à des variations des séquences régulatrices du gène (promoteur et/ou intron 1).

2) La voie de la vernalisation indépendante de *FLC*

La répression de *FLC* pourrait ne pas être le seul mécanisme de la vernalisation, comme l'indique le fait qu'un mutant nul *flc* conserve une faible réponse à la vernalisation (Michaels and Amasino, 2001). En effet, il existe d'autres gènes dont l'expression est influencée par la vernalisation. Ces gènes codent pour des protéines à boîte MADS et peuvent être divisés en deux groupes : des répresseurs de floraison, dont l'expression est inhibée par la vernalisation, et des inducteurs de floraison, dont l'expression est induite par la vernalisation.

- ❓ La première catégorie comprend quatre des cinq gènes de la famille des *MADS AFFECTING FLOWERING* (*MAFs* : *MAF1* à *MAF5*). En effet, *MAF1*, *MAF2*, *MAF3* et *MAF4* sont des inhibiteurs de floraison (Figure II.1) tandis que *MAF5* est un promoteur de floraison. Il s'agit de gènes dont la séquence est proche de celle de *FLC* (Ratcliffe *et al.*, 2001 ; Scortecci *et al.*, 2001). *MAF2* montre la particularité de ne pas être inhibé par de courtes périodes de vernalisation ; il semble être requis pour empêcher une induction florale prématurée suite à une brève période de froid (Ratcliffe *et al.*, 2003). L'expression de la plupart de ces gènes est également régulée par le complexe PAF1, le complexe SWR1 et le gène *HUA2* (He *et al.*, 2004 ; Oh *et al.*, 2004 ; Deal *et al.*, 2005 ; Doyle *et al.*, 2005 ; March-Díaz *et al.*, 2006 ; Martin-Trillo *et al.*, 2006).

❓ La deuxième catégorie comprend deux gènes de type *AGAMOUS LIKE* (*AGL*). Une mutation dans le gène *AGL24* induit une floraison tardive indépendamment de *FLC* (Michaels *et al.*, 2003b). En effet, l'expression de *AGL24* chez un écotype Col est la même que chez un génotype Col possédant un haut niveau d'expression de *FLC*, comme par exemple chez un mutant de la voie autonome (*ld*) ou dans une plante transgénique portant un allèle *FRI* actif. Une cible moléculaire de *AGL24* est le gène *SOC1* et une régulation positive réciproque de *AGL24* et *SOC1* a été démontrée (Michael *et al.*, 2003b).

Le gène *AGAMOUS LIKE 19* (*AGL19*) est d'une manière générale faiblement exprimé sauf dans les racines mais cette expression augmente en réponse à une période de froid prolongée (Schönrock *et al.*, 2006). Certains composants du complexe PCR2 semblent être requis pour réprimer *AGL19* en l'absence de vernalisation tandis que VIN3 est nécessaire pour l'activation de son expression suite à un traitement vernalisant.

3) Les autres fonctions des gènes *FLC* et *MAF*

3.1) FLC et l'horloge biologique

L'horloge circadienne contrôle de nombreux processus qui se produisent de manière rythmique avec une périodicité qui - en libre parcours - est proche de 24h. La période est peu sensible à la température ambiante ; cette propriété est due à un processus de 'compensation thermique'. Des études récentes montrent que *FLC* est un régulateur de l'horloge circadienne et intervient dans la compensation thermique. Ainsi, le mapping de QTLs (Quantitative trait loci) associés à la variation naturelle de la périodicité du mouvement des feuilles a montré que *FLC* allonge la période endogène (Swarup *et al.*, 1999 ; Edwards *et al.*, 2005). Cette augmentation de période présente un effet de dose ; elle est plus marquée chez des plantes surexprimant *FLC* que chez des écotypes possédant un allèle *FLC* dominant (Salathia *et al.*, 2006). Edwards *et al.* (2006) ont par

ailleurs identifié le locus *FLC* comme responsable de la variation naturelle de l'écotype Cape Verde Island (Cvi), qui présente une période plus longue que *Ler* ($\pm 0.75h$), mais uniquement à 27°C. *FLC* semble donc requis pour allonger la période circadienne à haute température ; ce mécanisme permet vraisemblablement de compenser une diminution de la période généralement induite par une augmentation de la température ambiante. Paradoxalement à cet effet des hautes températures, la vernalisation raccourcit également la période circadienne, et ce via un mécanisme indépendant de *FLC* (Salathia *et al.*, 2006).

3.2) *FLC/MAF1* et l'induction de la floraison par les températures élevées

La floraison d'*A. thaliana* est sensible à la température ambiante (Lempe *et al.*, 2005). Par rapport à la température de 23°C, habituellement utilisée pour les cultures, Blásquez *et al.* (2003) ont montré un retard significatif de la floraison à 16°C, en JLs de 16h, chez l'écotype *Ler*, tandis que Balasubramanian *et al.* (2006a) ont observé une accélération à 27°C en JCs, chez les écotypes Col et *Ler*. Des mutants de la voie autonome ou des écotypes présentant une forte activité *FLC* ne sont pas sensibles à la température, mais bien des mutants *flc*, ce qui suggère que *FLC* bloque le processus. La cartographie de QTLs associés à la variation naturelle de cette 'thermoinduction' de la floraison a permis d'identifier *MAF1* (aussi appelé *FLM*) ; l'épissage alternatif des transcrits de ce gène codant pour un répresseur de la floraison pourrait être impliqué dans le processus (Balasubramanian *et al.*, 2006a).

Les autres Brassicaceae

Plusieurs gènes dont la séquence est homologue à celle de *FLC* ont été isolés chez d'autres espèces de la famille des Brassicaceae (Tableau II.2).

Parmi ces gènes, seuls ceux de *B. napus*, *B. oleracea*, *B. rapa* et *Thellungiella halophila*, ont fait l'objet d'études préliminaires visant à caractériser leur rôle dans la réponse à la vernalisation.

La fonction des gènes *BnFLCs* a été déterminée par la transformation d'*A.*

thaliana avec une construction comprenant un des 5 gènes (*BnFLC1* à *BnFLC5*) sous le contrôle d'un promoteur constitutif 35S (Tadege *et al.*, 2001). Les 5 gènes de *B. napus* se sont avérés capables de retarder la floraison d'*A. thaliana* ; ils semblent donc tous fonctionnels et orthologues à *FLC*. Les gènes *BnFLCs* sont exprimés dans tous les tissus mais, contrairement à *FLC*, plus faiblement dans le système racinaire que dans l'apex de tige.

Chez *B. oleracea* (cv. *Capitata*), *BoFLC4-1* joue un rôle similaire à celui de *FLC* chez *A. thaliana*, mais uniquement au stade adulte. En effet, il a été montré que la vernalisation de graines n'accélère pas la floraison (Friend, 1985), et n'inhibe pas l'expression de *BoFLC4-1* (Lin *et al.*, 2005). Ces résultats suggèrent l'existence de mécanismes régulant la réponse à la vernalisation au cours du développement des plantes. L'analyse de ces mécanismes serait très intéressante dans le cadre de l'étude de la floraison des espèces bisannuelles ou pérennes.

Tableau II.2. Les gènes homologues à *FLC* isolés chez différentes Brassicaceae.

Espèce	Nombre de locus	Nom du locus	N° accès (GenBank)	Références	
<i>Brassica rapa</i>	cv. <i>Maeryuk</i>	1	<i>BrFLC</i>	AY273164	Kim <i>et al.</i> , 2006a
cv. <i>Samijn</i>	1	<i>BrFLC</i>	AY273162	–	
ssp. <i>oleifera</i>	4	<i>BrFLC1</i> <i>BrFLC2</i> <i>BrFLC3</i> <i>BrFLC5</i>	AY115678 AY115676 AY115677 AY115675	Schranz <i>et al.</i> , 2002	
ssp. <i>pekinensis</i>	1	<i>BrpFLC</i>	AY364013	Li <i>et al.</i> , 2005	
5		<i>BrFLC1</i> <i>BrFLC2</i> <i>BrFLC3a</i> <i>BrFLC3b</i> <i>BrFLC5</i>	–	Kim <i>et al.</i> , 2006a	
3		<i>BrFLC1</i> <i>BrFLC2</i> <i>BrFLC3</i>	DQ866874 DQ866875 DQ866876	Kim <i>et al.</i> , 2006c	
<i>Brassica oleracea</i>	–	3	<i>BoFLC1</i> <i>BoFLC3</i> <i>BoFLC5</i>	AY115674 AY115673 AY115672	Schranz <i>et al.</i> , 2002
cv. <i>Alboglabra</i>	3	<i>BoFLC1</i> <i>BoFLC3</i> <i>BoFLC5</i>	AM231517 AM231518 AM231519	–	

<i>cv. Capitata</i>	2	<i>BoFLC3-2</i> <i>BoFLC4-1</i>	AY306123 AY306122	Lin <i>et al.</i> , 2005
1	<i>BoFLC2</i>		DQ222849	Okazaki <i>et al.</i> , 2007
<i>cv. Italica</i>	4	<i>BoFLC1</i> <i>BoFLC3</i> <i>BoFLC4</i> <i>BoFLC5</i>	AM231521 AM231523 AM231524 AM231526	–
1	<i>BoFLC2</i>		DQ222850	Okazaki <i>et al.</i> , 2007
<i>Brassica napus</i>	5	<i>BnFLC1</i> <i>BnFLC2</i> <i>BnFLC3</i> <i>BnFLC4</i> <i>BnFLC5</i>	AY036888 AY036889 AY036890 AY036891 AY036892	Tadege <i>et al.</i> , 2001
<i>Brassica juncea</i>	2	<i>BjFLC3</i> <i>BjFLCx</i>	AY266265 AY268931	Martynov and Khavkin, 2004
<i>Raphanus sativus</i>	1	<i>RsFLC</i>	AY273160	–
<i>Barbarea verna</i>	1	<i>BvFLC</i>	–	Tague <i>et al.</i> , 2004
<i>Arabidopsis arenosa</i>	2	<i>AaFLC1</i> <i>AaFLC2</i>	DQ167446 DQ167444	Wang <i>et al.</i> , 2006
<i>Arabidopsis suecica</i>	1	<i>AsFLC</i>	DQ167447	Wang <i>et al.</i> , 2006
<i>Arabidopsis lyrata</i>	1	<i>AlFLC</i>	AY769865	Caicedo <i>et al.</i> , 2004
<i>Thellungiella halophila</i>	1	<i>ThFLC</i>	AY957537	Fang <i>et al.</i> , 2006

Li *et al.* (2005) ont isolé un gène *FLC* chez *B. rapa* (ssp. *pekinensis* cv. *Chundawang*), appelé *BrpFLC*, dont l'expression diminue en réponse à une période de froid. Chez des plantes non vernalisées, le niveau d'expression de *BrpFLC* diffère suivant le cultivar analysé : il est plus faiblement exprimé chez un cultivar à floraison précoce par rapport à un cultivar à floraison tardive. Une période de froid (1-2°C) de quatre semaines suffit à réprimer l'expression de *BrpFLC* mais les écotypes les plus tardifs exigent neuf semaines de vernalisation pour une répression totale. Kim *et al.* (2006b) ont isolé trois gènes *FLC* chez un autre cultivar de *B. rapa* (ssp. *pekinensis* cv. *Samjin*) : *BrFLC1*, *BrFLC2* et *BrFLC3*. Les deux gènes *BrFLC1* et *BrFLC2* sont largement exprimés dans toutes les parties de la plante tandis que *BrFLC3* est plus faiblement exprimé, voir indétectable dans les racines. Chez des plantes non vernalisées, le niveau d'expression de ces trois gènes diffère également chez trois lignées consanguines analysées. Un traitement vernalisant de 40 jours à 4°C réduit l'expression des trois *BrFLC* et accélère la

floraison de *B. rapa*. Après un tel traitement, l'expression de ces gènes reste réprimée lorsque les plantes sont remises à une température de culture standard.

Un seul cDNA de type *FLC-like* a été isolé chez *T. halophila* (*ThFLC*) (Fang *et al.*, 2006). Une période de vernalisation au stade graine (6 semaines à 4°C) réduit l'expression de *ThFLC* et accélère la floraison.

Les autres dicotylées...

Les nombreuses tentatives d'isolement de séquences orthologues à *FLC* en dehors de la famille des Brassicaceae sont restées longtemps infructueuses (Schläppi and Patel, 2001 ; Tadege *et al.*, 2003 ; Hecht *et al.*, 2005). Récemment, Reeves *et al.* (2006) ont cependant identifié des homologues potentiels chez les Caryophyllidées, les Rosidées et les Asteridées, grâce à une analyse bioinformatique et phylogénétique approfondie. Les auteurs ont analysé le rôle de *FLC* chez la betterave (*Beta vulgaris*) ; le gène *BvFLC* est capable de retarder la floraison d'*A. thaliana* et son expression est réprimée en réponse à la vernalisation. Il se pourrait dès lors que le rôle de *FLC* soit conservé chez un grand nombre de taxons.

Les monocotylées

Jusqu'à présent, aucun gène homologue à *FLC* n'a été trouvé chez les monocotylées, malgré les essais rapportés sur le blé tendre (*Triticum aestivum*), l'en grain (*Triticum monococcum*), l'orge (*Hordeum vulgare*) ou l'ivraie vivace (*Lolium perenne*). Cependant, un couple de gènes liés à la vernalisation semble être présent communément chez toutes ces espèces de la famille des Poaceae (Tableau II.3). Ces deux gènes ont été appelés *VRN-1* et *VRN-2* sans avoir toutefois de relation avec les gènes d'*A. thaliana* portant le même nom. Le gène *VRN-1* code pour un facteur de transcription à boîte MADS, dont la séquence est homologue à celle du gène *API*, tandis que *VRN-2* code pour un facteur de transcription de la famille des protéines à doigts de zinc. Le gène *VRN-2* est inhibiteur de floraison ; il réprime l'expression de *VRN-1*. La vernalisation réprime l'expression de *VRN-2*.

Tableau II.3. Noms conférés aux loci *VRN-1* et *VRN-2* chez différentes Poaceae.

<i>Locus</i>	<i>Triticum aestivum</i> (hexaploïde)	<i>Triticum monococcum</i> (diploïde)	<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Lolium perenne</i>
<i>VRN-2</i>	<i>VRN-A2/VRN-B2/</i> <i>VRN-D2</i>	<i>VRN-A^m₂</i>	<i>VRN-H2</i>	<i>LpVRN2</i>
<i>VRN-1</i>	<i>VRN-A1/VRN-B1/VRN-D1</i>	<i>VRN-A^m₁</i>	<i>VRN-H1</i>	<i>LpVRN1</i>

Des variations alléliques au niveau du couple *VRN-1/VRN-2* sont responsables des différents écotypes connus parmi ces graminées (Yan *et al.*, 2003 ; Yan *et al.*, 2004 ; von Zitzewitz *et al.*, 2005). Un allèle dominant du locus *VRN-2* (*Vrn-2*) est responsable du besoin strict de vernalisation des écotypes d'hiver. La présence d'un allèle récessif de ce locus (*vrn-2*) ou d'un allèle dominant *VRN-1* (*Vrn-1*) rend compte des écotypes d'été qui fleurissent indépendamment de la vernalisation. Plus spécifiquement, chez *T. aestivum*, Loukoianov *et al.* (2005) ont montré que la présence d'un seul allèle dominant *Vrn-1* parmi les trois copies du locus *VRN-1* est suffisante pour déterminer l'écotype d'été.

Une étude comparative de la séquence du gène *VRN-1* chez *H. vulgare*, *T. aestivum*, *T. monococcum* et *T. turgidum* (tetraploïde) a montré que l'allèle dominant *Vrn-1* est dû à une délétion d'un fragment d'une longueur approximative de 2.8-kb dans l'intron 1 (Fu *et al.*, 2005).

Chez certaines monocotylées d'hiver, la vernalisation peut être remplacée par une exposition à des JCs. Ce phénomène n'a jamais été décrit chez *A. thaliana* mais est commun chez les espèces de la sous-famille *Festucoideae*. Ainsi, chez *H. vulgare* et *T. monococcum*, l'expression de *VRN-2* a est réprimée par cette exposition à des JCs (Dubcovsky *et al.*, 2006 ;

Trevaskis *et al.*, 2006). Par contre, l'expression de *VRN-1* n'est pas influencée par ce traitement photopériodique, indiquant l'existence d'autres répresseurs de ce gène.

Récemment, trois gènes *VIL* (*VIN3-Like*), appelés *TmVIL1*, *TmVIL2* et *TmVIL3*,

ont été identifiés chez *T. monococcum* (Fu *et al.*, 2007) ; ces trois gènes possèdent des éléments communs au gène *VIN3* d'*A. thaliana*.