

La vigne (*Vitis vinifera*) est une plante poussant à l'origine dans les forêts où elle grimpe aux arbres grâce à des organes modifiés en vrilles. Deux cultivars (Pinot noir et Pinot Meunier) représentent à eux seuls 74% des vignes cultivées pour la production de champagne. Afin de préserver leurs caractères, ces vignes sont propagées uniquement de façon végétative.

Chez la vigne, les inflorescences et les vrilles ont une origine commune : elles se forment à partir de primordiums non déterminés qui sont associés aux méristèmes de tige. Sur les tiges en pleine croissance, ces primordiums deviennent des vrilles alors que, associés à des bourgeons dormants, ces mêmes primordiums deviennent des inflorescences. Ce choix est aussi influencé par des facteurs hormonaux, p.e. l'acide gibbérellique (GA).

Le Pinot Meunier est en fait un « mutant périnclinal » obtenu à partir du Pinot noir. La seule différence visible entre ces deux cultivars est que le Pinot Meunier est « tomenteux », ce qui signifie qu'il possède une densité beaucoup plus forte de poils épidermiques à l'extrémité des tiges et sur les jeunes feuilles que le Pinot noir.

Il est possible de régénérer des plantes à partir spécifiquement de cellules des couches L1 ou L2 du méristème apical caulinaire. Dans le cas du Pinot Meunier, les plantes régénérées à partir de cellules L2 sont tout à fait identiques au Pinot noir. Par contre, les plantes régénérées à partir de cellules de la couche L1 sont tomenteuses, naines et forment des inflorescences à partir de tous les primordiums associés aux méristèmes de tige. Tous ces caractères sont liés à une seule mutation dans un gène intervenant dans le métabolisme du GA, nommé *Vvgail*. Les cellules L2 possèdent deux allèles sauvages de *Vvgail* alors que les cellules L1 possèdent un allèle sauvage et un allèle muté. Les plantes régénérées à partir de cellules L1 contiennent une aussi grande concentration de GA que les plantes dérivant de L2 et l'apport exogène de GA ne modifie en rien leur phénotype.

Les plantes dérivant de cellules L1 ont été croisées avec des *Vitis* sauvages. Deux populations de plantes constituent la descendance : certaines ont une taille normale, forment des vrilles sur les tiges en croissance et ne sont pas tomenteuses alors que d'autres sont naines, forment des inflorescences partout et sont tomenteuses.

Le tableau suivant résume l'ensemble des caractères morphologiques des plantes décrites ici :

Plante	Taille	Vrilles/inflorescences*	Tometeuse
Pinot noir	Grande	Vrilles	Non
Pinot Meunier	Grande	Vrilles	Oui
L2	Grande	Vrilles	Non
L1	Naine	Inflorescences	Oui
L1 X sauvage	Grande	Vrilles	Non
	Naine	Inflorescences	Oui

* sur les tiges en croissance

- 1- Représenter schématiquement un méristème apical caulinaire en identifiant bien les différentes couches et zones qui le constituent.
- 2- Les cultivars tels que le Pinot Meunier sont nommés « mutants périnclinaux » ou encore « chimères périnclinales ». Expliquer ce que cela signifie.
- 3- Quel serait le résultat de l'autofécondation des plantes dérivées de cellules L1 ? Même question pour les plantes dérivées de L2.
- 4- D'après les informations fournies, quelles sont les fonctions du GA pour le développement de la vigne ?
- 5- Quelle est la fonction exacte du produit du gène *Vvgail* ?

- 6- Comment expliquer que les plantes dérivées des cellules L1 ont un phénotype différent des plantes du cultivar Pinot Meunier ?
- 7- Est-il possible de faire des vignes transgéniques pour la production de champagne ?

Corrigé :

1- voir notes de cours

2- Les cellules des couches L1 et L2 ont une origine différente puisqu'elles sont génétiquement différentes.

3- L1 X L1 : *Vvgail/vvgail* X *Vvgail/vvgail*

25% homozygotes sauvages : grandes, vrilles, non tomenteuses

50% hétérozygotes : naines, inflorescences, tomenteuses

25% homozygotes mutées : pas de phénotype prévisible d'après les données fournies (probablement létal)

L2 X L2 : *Vvgail/Vvgail* X *Vvgail/Vvgail*

100% homozygotes sauvages : grandes, vrilles, non tomenteuses

4- D'après les différents phénotypes, GA intervient dans :

- choix vrilles/inflorescences (GA favorise développement des vrilles)

(NB par défaut : inflorescence. Vrille est une inflorescence modifiée)

- élongation de la tige

- développement des poils

5- Le produit de *Vvgail* intervient dans la réponse à GA et non dans la synthèse de cette hormone puisqu'un apport extérieur de GA ne modifie pas le phénotype.

6- Chez le Pinot Meunier, seules les cellules de la couche L1 ont un allèle *vvgail* muté alors que toutes les autres cellules de la plante possèdent 2 allèles sauvages. Chez les plantes régénérées à partir des cellules L1, toutes les cellules sont hétérozygotes pour ce gène. (Ceci explique que, chez le Pinot Meunier, le phénotype ne se manifeste qu'au niveau des cellules formant les poils (couche L1) alors que les autres caractères phénotypiques (taille et vrilles) dépendent aussi de cellules des couches L2 et L3, qui sont toutes homozygotes sauvages pour le gène *Vvgail*).

7- Le processus de transgénèse passe par la régénération d'une plante à partir d'une seule cellule. Donc :

- pour le Pinot noir : OK parce que toutes les cellules sont génétiquement identiques

- pour le Pinot Meunier :

- si la plante provient d'une cellule L1 : phénotype mutant (voir tableau)

- si la plante provient d'une autre cellule : il n'y a plus que des allèles *Vvgail*

sauvages dans toutes les cellules : on a transformé le Pinot Meunier en Pinot Noir !

(il faudrait donc arriver à recréer la chimère péricleinale pour retrouver toutes les propriétés du Pinot Meunier...).

Un effet paternel sur l'embryogenèse...

Le développement de la microspore fait intervenir deux mitoses : le résultat de la première mitose est la formation de la cellule végétative du grain de pollen dans laquelle se trouve une plus petite cellule, la cellule générative. La deuxième mitose produit les deux gamètes mâles à partir de la cellule générative. Ces deux gamètes seront utilisés pour la double fécondation typique des Angiospermes.

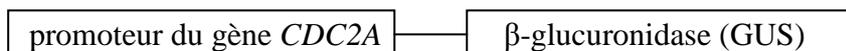
Le gène unique d'*Arabidopsis thaliana* nommé *CDC2A* code une « cyclin-dépendant serine-threonine kinase ». Un mutant d'insertion (nommé *cdc2a*) dans ce gène a été obtenu : le gène muté ne produit plus du tout de protéine *CDC2A*. Des plantes homozygotes pour la mutation *cdc2a* n'ont jamais pu être obtenues. Les plantes hétérozygotes (*CDC2A/cdc2a*) présentent pour leur part un développement végétatif tout à fait normal. Leur floraison est aussi normale et le gamétophyte femelle ne présente aucune anomalie. Cependant, pour environ la moitié des grains de pollen, la deuxième mitose du développement du gamétophyte mâle n'a pas lieu de sorte que les grains de pollen matures ne comportent chacun que deux cellules : la cellule végétative normale et une autre cellule. Tous les grains de pollen sont néanmoins viables et germent normalement. Pour les grains de pollen n'ayant pas subi la deuxième mitose, il a été montré que « l'autre cellule » (la cellule générative n'ayant pas subi de mitose) se comporte comme un gamète et va spécifiquement féconder l'oosphère.

L'autofécondation des mutants *cdc2a* produit le résultat suivant : le développement de l'embryon s'arrête au stade globulaire dans environ la moitié des graines. Le début de développement de l'albumen (prolifération des noyaux) est normal dans tous les cas, c'est-à-dire même chez les graines dont l'embryon va avorter.

- 1- Expliquer ce qu'est la double fécondation des Angiospermes.
- 2- L'existence d'un effet **maternel** sur le développement embryonnaire des Angiospermes avait déjà été décrit. Expliquer ce qu'est cet effet maternel.
- 3- Le tableau suivant donne les résultats de croisements impliquant le mutant *cdc2a* et des plantes sauvages. Quelle information manque dans ce tableau pour démontrer un effet **paternel** sur le développement embryonnaire ? Expliquer.

Croisement	% graines normales	% graines avec embryon avorté
sauvage X sauvage	96	4
<i>cdc2a</i> X <i>cdc2a</i>	51	49
<i>cdc2a</i> X sauvage	97	3
sauvage X <i>cdc2a</i>	58	42

- 4- Afin d'étudier plus en détails le phénomène d'effet paternel, la construction suivante a été réalisée et introduite dans des plants d'*Arabidopsis* sauvages et dans le mutant *cdc2a*:



Le pollen provenant des deux types de plantes transgéniques a été utilisé pour polliniser des plantes d'*Arabidopsis* sauvages. Sachant que c'est cette expérience qui a démontré la fécondation spécifique de l'oosphère par l'unique gamète des grains de pollen mutants, prévoir le résultat de ces croisements, c'est-à-dire : coloration bleue due à GUS dans l'embryon et/ou dans l'albumen ? Dans quelle proportion des cas ?

- 5- Quelle serait la fonction précise de la protéine *CDC2A* ?

- 6- Pourquoi n'y a-t-il pas d'homozygotes *cdc2a/cdc2a* ?
- 7- Chez le mutant fis (« fertilization independant seed »), il y a prolifération de l'albumen en absence de fécondation, donc en absence de développement d'un embryon. Expliquer ce que les mutants *cdc2a* et *fis* nous apprennent au sujet de la signalisation contrôlant le développement de l'albumen.

Corrigé :

- 1- voir notes de cours
- 2- effets maternels sporophytiques et gamétophytiques : voir notes de cours
- 3- Il manque l'information sur l'origine du pollen dans les croisements entre plantes sauvages et *cdc2a*.

Croisement ♀ ♂	% graines normales	% graines avec embryon avorté
<i>cdc2a</i> X sauvage	97	3
sauvage X <i>cdc2a</i>	58	42

Dans les 2 croisements, tous les embryons héritent d'un allèle *cdc2a* muté. Cela n'a des conséquences néfastes que lorsque l'allèle muté provient du pollen (parent mâle). Remarque : le % de graines avortées n'est pas de 100% puisque le mutant *cdc2a* est hétérozygote : 50% des grains de pollen ont l'allèle *CDC2A* sauvage...

- 4- Construction GUS dans plante sauvage : 100% du pollen avec 2 gamètes
- 1 gamète ♂ féconde oosphère → expression GUS dans tous les embryons
 - 1 gamète ♂ féconde les noyaux centraux → GUS dans tous les albumens

Construction GUS chez mutant *cdc2a* (*CDC2A/cdc2a*) : 50% des grains de pollen ont 2 gamètes ♂ et 50% des grains de pollen n'ont qu'un gamète ♂. Donc, dans au moins 50% des cas, l'embryon et l'albumen expriment GUS. Pour les autres, 2 hypothèses :

- 1^{ère} hypothèse : la fécondation est aléatoire. La fécondation par le pollen à 1 gamète produira : une fois sur deux un embryon exprimant GUS et une fois sur deux un albumen exprimant GUS (jamais les 2). La proportion globale sera :
Embryon et albumen GUS (50%), embryon GUS (25%), albumen GUS (25%)
- 2^{ième} hypothèse : la fécondation n'est pas aléatoire et le gamète unique fécondera de préférence l'oosphère. Dans tous les cas de fécondation par du pollen à 1 gamète, c'est donc l'embryon qui exprimera GUS. La proportion globale sera :
Embryon et albumen GUS (50%), embryon GUS (50%).

5- Le gène *CDC2A* contrôle l'entrée en mitose de la cellule générative (et aussi de cellules de l'embryon, voir question suivante). En absence de cette fonction, la cellule générative ne subit donc pas la mitose qui devrait donner 2 gamètes.

6- Il faut supposer que la fonction du gène *CDC2A* est essentielle et qu'elle ne peut être assurée que par ce gène (pas de redondance de fonction). En absence de cette fonction, il y a un problème de mitoses dans l'embryon et celui-ci ne peut se développer.

7- Le mutant *fis* indique que l'embryon exerce un contrôle négatif sur la prolifération de l'albumen. A l'inverse, le mutant *cdc2a* révèle une signalisation positive de l'embryon sur l'albumen : même en absence de fécondation des noyaux centraux (donc à l'état 2n), l'albumen commence à proliférer s'il y a présence d'un embryon. Autrement dit, le signal déclenchant la prolifération de l'albumen n'est pas la fécondation des noyaux centraux mais la présence d'un embryon.

Un SMS pour le développement des bourgeons axillaires...

La forme des plantes et de leur inflorescence dépend de l'activité de différents méristèmes au cours de la période de développement post-embryonnaire. Les ramifications de l'axe principal de la plante ont pour origine les bourgeons axillaires. Ces bourgeons présentent trois phases de développement :

- 1- formation d'un méristème axillaire à partir des cellules situées à l'aisselle des feuilles, du côté adaxial ;
- 2- fonctionnement pour une durée limitée du méristème axillaire qui a pour résultat la mise en place d'un certain nombre de feuilles (plus exactement d'ébauches foliaires) pour former un bourgeon axillaire. Le développement de ces bourgeons axillaires est généralement inhibé par le bourgeon terminal (phénomène de dominance apicale) ;
- 3- reprise de l'activité du bourgeon axillaire (phénomène nommé « débourrement ») pour former une tige feuillée sous contrôle de facteurs externes et internes.

L'architecture de la plante dépendra donc de deux facteurs : l'initiation de la formation des méristèmes axillaires et la régulation du développement des bourgeons axillaires.

Le gène *LAS* (*Lateral Suppressor*) d'*Arabidopsis* contrôle la formation des méristèmes axillaires. Chez les mutants *las*, le nombre de méristèmes axillaires est fortement réduit. Par contre, les ramifications de l'inflorescence ne sont pas affectées. Des gènes équivalents à *LAS* existent chez toutes les Angiospermes. Chez les Dicotylédones, la mutation de ces gènes produit le même phénotype que chez *Arabidopsis*. Par contre, chez les Monocotylédones, la mutation de ces gènes affecte à la fois la ramification de la tige et de l'inflorescence.

Chez *Arabidopsis*, le gène *LAS* s'exprime dans les primordia de feuilles dès leur formation. L'expression devient ensuite progressivement localisée du côté adaxial, dans la région de l'aisselle, c'est-à-dire à la frontière entre le méristème apical caulinaire et le primordium de feuille. Toutes les cellules exprimant le gène *LAS* expriment aussi le gène *STM* (*Shoot Meristemless*), et peuvent ainsi permettre la formation d'un méristème axillaire.

Les hormones auxine et cytokinine contrôlent le phénomène d'inhibition/débourrement des bourgeons axillaires mais plusieurs observations ont démontré qu'elles ne constituent pas le signal agissant directement au niveau du bourgeon. Un autre signal mobile, nommé « Shoot Multiplication Signal » (SMS) représenterait le véritable régulateur du développement des bourgeons axillaires. La nature et le fonctionnement de ce signal ont été précisés par l'étude des mutations des gènes *MAX* (*More Axillary Growth*). La mutation de chacun des gènes *MAX* (*MAX1*, *MAX2*, *MAX3*, *MAX4*) ou d'une combinaison de ces gènes provoque toujours le même phénotype : l'inhibition du développement des bourgeons axillaires est réduite et la plante présente donc un plus grand nombre de ramifications. Le signal mobile consisterait en une ou quelques molécule(s) dérivée(s) de caroténoïdes.

Le fonctionnement des gènes *MAX* a particulièrement été étudié par des greffes de tiges mutées sur des racines sauvages: dans ces conditions, les tiges *max3* et *max4* présentent un phénotype sauvage alors que les tiges *max2* ont un phénotype mutant.

- 1- Comment faire la distinction entre des gènes qui affectent l'initiation de la formation des méristèmes axillaires et des gènes qui interviennent dans la signalisation pour le contrôle du développement des bourgeons axillaires ?
- 2- Pourquoi la mutation dans les gènes *LAS* et les gènes équivalents produit-elle un effet au niveau de l'inflorescence des Monocotylédones et pas des Dicotylédones ?
- 3- Quelle serait la fonction du gène *LAS* (de façon générale et au niveau moléculaire)? Comment le vérifier ?
- 4- Deux hypothèses peuvent expliquer la formation d'un méristème axillaire à l'aisselle de la feuille, c'est-à-dire dans un organe différencié : soit un petit groupe de cellules

est resté à l'état indifférencié, soit des cellules différenciées se sont dé-différenciées. Quelle est l'hypothèse la plus vraisemblable dans le cas d'Arabidopsis ?

- 5- Quelle est la fonction précise du SMS ?
- 6- Que peut-on conclure de la fonction des gènes *MAX3* et *MAX4* par rapport au gène *MAX2* ? D'après vous, où ces gènes sont-ils exprimés ?
- 7- Est-ce qu'il y a une relation entre le développement des bourgeons axillaires et le développement du système vasculaire ?

Corrigé :

1- Par l'examen des phénotypes mutants : si le gène contrôle l'initiation, il y aura un moins grand nombre de méristèmes (bourgeons) axillaires chez les mutants. Pour un gène intervenant dans la signalisation, le nombre de bourgeons ne sera pas modifié mais la fréquence de débourrement sera affectée.

2- Il faut supposer que, chez les Monocotylédones, le gène *LAS* seul contrôle la ramification des tiges et des inflorescences alors que, chez les Dicotylédones, il y a redondance de fonction et qu'un autre gène intervient au niveau de l'inflorescence.

3- Le gène *LAS* intervient dans la formation des méristèmes axillaires puisque leur nombre est réduit chez les mutants. Au niveau moléculaire, l'effet du produit de *LAS* serait d'activer l'expression du gène *STM*, dont la fonction est de maintenir les cellules dans un état de croissance indéterminée au niveau du SAM.

Vérifications :

- chez le mutant *las*, les cellules qui devraient former le méristème axillaire ne devraient pas exprimer *STM* ;

- la surexpression de *LAS* (*35S-LAS*, par exemple) devrait entraîner une surexpression de *STM* et la formation d'un plus grand nombre de méristèmes axillaires.

4- Puisque l'expression de *LAS* (et par conséquent de *STM*) commence dès le jeune primordium de feuille, il semble donc plus probable qu'un petit groupe de cellules déterminées à former le méristème axillaire ne se sont jamais différenciées.

5- Le signal SMS a un effet inhibiteur sur l'activité des bourgeons axillaires puisque les mutants *max* présentent une plus grande fréquence de débourrement.

6-

Génotype	WT	max 2, 3 ou 4	Tige max 3 ou 4 sur racine WT	Tige max 2 sur racine WT
Phénotype	WT	Ramifications +++	WT	Ramifications +++
Production signal SMS	+	?	+ (pas dans la tige)	+
Perception signal SMS	+	?	+	-

Conclusion: *MAX 3 et 4*: production du signal (racines)
MAX 2: perception signal (bourgeons axillaires)

7- Indirectement oui, puisque l'asymétrie de la feuille et du système vasculaire sont liées (gènes *REV...*) et que cette asymétrie (de la feuille) détermine l'emplacement du méristème (bourgeon) axillaire.

Le haricot magique : une légende ou un mutant de développement ?

« *Oui, mais c'est un haricot magique. Si tu le plantes, en une nuit il poussera jusqu'au ciel. (...) Quelle surprise ! Un énorme pied de haricot montait contre le mur, et poussait si haut que la tige se perdait dans les nuages.* » (*Jack et le haricot magique, conte britannique*).

L'étude de gènes contrôlant l'évocation florale chez *Arabidopsis thaliana* a servi de point de départ pour essayer de comprendre ce processus chez les plantes pérennes (vivaces). De façon inattendue, ces études ont permis de mieux comprendre les relations globales entre le mode de croissance et de développement des plantes annuelles (telles que *Arabidopsis* et le haricot) et pérennes (buissons et arbres).

En vous aidant de courts extraits et de quelques informations supplémentaires tirés de deux articles récents, vous répondrez aux questions suivantes :

- 1- Expliquer de façon générale comment est fait le choix de s'engager vers la floraison chez une plante telle que *Arabidopsis* (ne pas hésiter à faire un ou des schéma(s)).
- 2- Le premier article propose deux hypothèses pour expliquer comment les plantes pérennes continuent leur croissance chaque année tout en produisant des fleurs. Quelles sont ces deux hypothèses ? Suggérer une façon de vérifier laquelle des deux hypothèses est exacte ? Expliquer de quelle façon les données du deuxième article appuient l'une de ces deux hypothèses.
- 3- Pour déterminer si le maintien de la croissance indéterminée chez les mutants *ful soc* est uniquement dû au retard de floraison, la surexpression du gène *AGL19* a été utilisée. Qu'est-ce que cette expérience permet de conclure ? Que peut-on en déduire par rapport à la (aux) fonction(s) des gènes *FUL* et *SOC1* ?
- 4- Que peut-on conclure des expériences avec le gène *FT* ?
- 5- A partir de ces données, que peut-on conclure quant à l'origine et l'évolution des Angiospermes ?
- 6- Question bonus : en se basant sur les propriétés de la protéine FT, suggérer une approche qui permettrait d'accélérer la floraison d'un arbre sans que celui-ci ne soit transgénique.

Genetics of flower initiation and development in annual and perennial plants. Fui-Ching Tan and Steve M. Swain. *Physiologia Plantarum* 128: 8–17, 2006.

Some angiosperms complete their life cycle within a year (annual plants), and others have a longer reproductive life, which is characterized by the generation of new flowering and vegetative shoots every year (perennial plants). Despite the differences in their lifespan, the underlying genetics of flower induction and floral organ formation appears to be similar among these plants. (...) Although annuals appear to share many similarities with perennials in terms of gene function, they differ in their commitment to flowering. Once an annual reaches the reproductive phase, all meristems are typically converted into either floral or inflorescence meristems. In contrast, each year, each meristem of a mature perennial has the choice to produce either a vegetative or a reproductive shoot.

Since mature trees are defined as having the potential to produce flowers, the meristems present in buds giving rise to 'vegetative' shoots can be considered in one of two ways. In the first scenario, meristems in some buds may be truly vegetative and analogous to meristems produced by non-flowering juvenile trees or vegetative *Arabidopsis* seedlings. In this scenario, individual buds on a single mature tree can be considered to be equivalent to a population of *Arabidopsis* plants, some of which have initiated flowering and some of which are vegetative; in any given season, the proportions of vegetative and reproductive buds will

depend on the proportion of buds in which floral induction occurs. In the second scenario, the meristems in all buds may be potentially competent to produce flowers but, because of the prevailing local physiological conditions, are unable to do so. In this case, these meristems would be analogous, at least early in development, to meristems in other buds that do subsequently produce flowers and to meristems produced by a flowering *Arabidopsis* plant. One possibility is that some meristems undergo 'floral reversion' and become vegetative.

Flowering-time genes modulate meristem determinacy and growth form in *Arabidopsis thaliana*. Siegbert Melzer, Frederic Lens, Jérôme Gennen, Steffen Vanneste, Antje Rohde1 & Tom Beeckman. *Nature Genetics* 40: 1489-1492, December 2008.

Plants have evolved annual and perennial life forms as alternative strategies to adapt reproduction and survival to environmental constraints. In isolated situations, such as islands, woody perennials have evolved repeatedly from annual ancestors. Although the molecular basis of the rapid evolution of insular woodiness is unknown, the molecular difference between perennials and annuals might be rather small, and a change between these life strategies might not require major genetic innovations.

Plant growth originates from a small number of undifferentiated cells called meristems. Meristems can be determinate- that is, consumed for the formation of an organ- or indeterminate, meaning that they are active throughout the life span of a plant. Upon floral induction in annual plants, vegetative shoot meristems undergo the transition to inflorescence meristems. These inflorescence meristems will remain indeterminate for some time to generate determinate floral meristems giving rise to flowers. Finally, all meristems are consumed and the plants die in the same growing season. In contrast, perennial plants have evolved more elaborate life strategies to survive harsh environmental conditions for many years by forming perennial structures such as overwintering buds, bulbs or tubers, which contain at least one indeterminate meristem for the outgrowth in the next season. Often, perennial plants incorporate enormous amounts of long-lived and eventually dead biomass (wood) through cambial activity (secondary growth).

Arabidopsis thaliana is a small annual herb in which floral induction is controlled by different flowering-time pathways. These pathways depend on environmental cues, such as day length (photoperiod) and vernalization (cold temperature), or on plant age. *Arabidopsis* is a facultative long-day plant. After perceiving flowering-inducing long days, the key regulator of the photoperiodic pathway, *CONSTANS (CO)*, activates *FT (FLOWERING LOCUS T)* in the leaf vasculature. The FT protein is transported to apical meristems, where it triggers the floral transition. The *ft* mutants flower late only in long days, whereas the 35S:FT transgene triggers an extremely early and photoperiod independent flowering in wild type. *SOCI* and *FUL* are MADS box genes acting downstream of *FT* in apical meristems. Early upon floral induction *SOCI* and *FUL* are induced in apical meristems, and, later on, both genes are also expressed in procambial strands of developing inflorescences. *FUL* has been described for its role in fruit dehiscence, but as *SOCI* and *FUL* also as homo- and heterodimers, *FUL* might have additional functions that may be in part redundant to those of *SOCI* in areas of overlapping expression. The flowering-time regulator *AGL19 (AGAMOUS LIKE 19)* controls flowering downstream of a cold-perception pathway and acts independently of *FT* and *SOCI*.

Résumé des résultats

Les plantes mutées dans les gènes *SOC* et *FUL* ne présentent comme seule altération phénotypique qu'un retard de floraison (Tableau 1) et, comme les plantes sauvages, meurent une fois que la maturation des graines est complétée. Le double mutant *ful soc1* présente un plus grand retard de floraison mais, contrairement aux autres plantes, possède en plus une croissance indéterminée, c'est-à-dire qui se poursuit après que les graines ont été produites. Plus précisément les méristèmes de l'inflorescence redeviennent des méristèmes végétatifs (indéterminés) qui initient donc un deuxième cycle de croissance : de nouvelles rosettes de

feuilles sont produites sur l'axe de l'inflorescence originale. Le même phénomène se reproduit sur ces nouvelles rosettes, générant ainsi plusieurs cycles de croissance successifs. En conséquence, des plantes ayant l'aspect de buissons sont observées et leurs tiges possèdent de véritables cambiums et de la croissance secondaire typique des plantes ligneuses (pérennes).

Des phénotypes similaires ont ensuite été observés dans les plantes possédant les génotypes suivants :

35S-*AGL19* ful soc1, 35S-*FT* ful, 35S-*FT* soc1, 35S-*FT* ful soc1, ft ful, ft soc1

Tableau 1. Modification du moment de floraison (déterminée par le nombre de feuilles formées au moment de l'apparition de l'inflorescence) selon le génotype de la plante. Conditions de jours longs.

Génotype	Nombre de feuilles
sauvage	15
ful	19
soc1	28
ful soc1	39

Génotype	Nombre de feuilles
35S- <i>AGL19</i>	8
35S- <i>AGL19</i> ful soc1	15
35S- <i>FT</i>	5
35S- <i>FT</i> ful	10
35S- <i>FT</i> soc1	10
35S- <i>FT</i> ful soc1	26

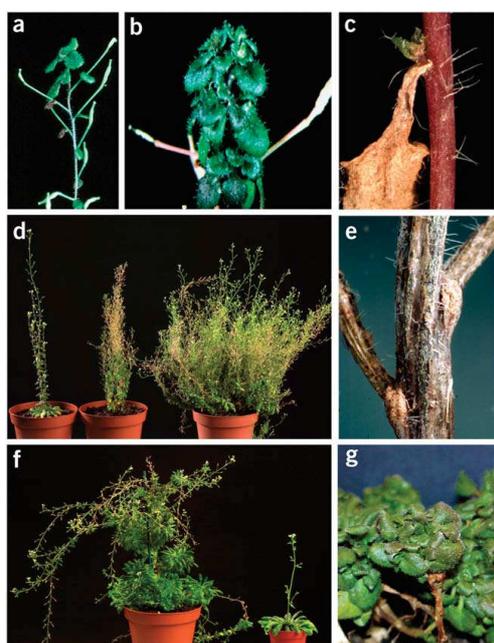


Figure 1: Perennial features in *soc1 ful* mutants.

(a) Floral reversion at the top of a *soc1 ful* inflorescence. (b) *soc1 ful* apical rosettes at a later stage than shown in a. (c) Dead basal **cauline leaf*** with a small arrested axillary shoot that will develop into an aerial rosette in the next growth wave. (d) Comparison of *soc1 ful* mutants grown in long days for 6 weeks (left), 3 months (middle) or 5 months (right). (e) Woody stem of a 4-month-old *soc1 ful* mutant in long days. (f) Comparison of an 8-month-old *soc1 ful* mutant with many aerial rosettes at the base and floral reversion at inflorescence meristems (left) and a 2-month-old wild-type plant (right) grown in short days. (g) A 14-month-old *soc1 ful* mutant with rosettes on lateral branches.



Figure 3: Different plant growth forms in *soc1-3* and *ful-2* mutants.

(a) A *ft ful* double mutant with an exaggerated indeterminate growth. (b) A 35S:*FT soc1 ful* plant showing a cushion-plant growth habit after 8 months of growth in short days. The inset shows a 35S:*FT* plant grown in short days. Scale bar, 10 cm.

*bractée inflorescentielle

Corrigé :

1- Voir notes de cours : les différents facteurs, notion de centre intégrateur...

2- 1^{ère} hypothèse : il y a sur l'arbre 2 populations de méristèmes, des méristèmes végétatifs et des méristèmes floraux.

2^{ème} hypothèse : tous les méristèmes sont potentiellement capables de produire des inflorescences mais le feront ou non selon les conditions. Les méristèmes seraient donc capables d'un retour à la croissance végétative (le méristème d'inflorescence n'est pas encore engagé dans une voie irréversible de floraison).

Vérification : on pourrait par exemple vérifier l'expression de gènes marqueurs de la floraison dans plusieurs méristèmes d'un même arbre : si l'expression n'est trouvée que dans une partie des méristèmes, l'hypothèse 1 est correcte ; si le marqueur s'exprime dans tous les méristèmes, c'est plutôt l'hypothèse 2 qu'il faut privilégier...

D'après l'article, c'est plutôt la 2^{ème} hypothèse qui est correcte puisqu'on observe chez des mutants (*ful/soc1*, par exemple) la transformation d'un méristème d'inflorescence en méristème végétatif.

3- Le retard de floraison n'est pas en cause puisque les plantes *35S-AGL19 ful/soc1* fleurissent aussi vite que les plantes sauvages (après avoir formé 15 feuilles) mais présentent néanmoins le même phénotype que les mutants *ful/soc1* (*AGL19* favorise une floraison hâtive).

Puisque le retard de floraison n'est pas en cause, on en déduit que les gènes *FUL* et *SOC1* participent ensemble au choix croissance déterminée vs indéterminée : en empêchant la reprise de croissance, ils favorisent le port herbacé de la plante par rapport à un port buissonnant.

4- La surexpression de *FT* (*35S-FT*) chez les mutants *ful* OU *soc1* ou *ful/soc1* produit le même phénotype. Aussi, les doubles mutants *ft/ful* et *ft/soc1* présentent les mêmes phénotypes. On en conclut que les gènes *FT* et *SOC1* ont des fonctions au moins en partie identiques.

Comme pour *AGL19*, la surexpression de *FT* accélère le processus de floraison sans effet sur le phénotype produit par les mutations *ful* et *soc1*. Cela confirme que le moment de floraison n'est pas en cause.

Le produit de *FT* participe lui-même au choix du mode de croissance puisque les doubles mutants *ft/ful* et *ft/soc1* ont le même phénotype que *ful/soc1* (ce qui n'est pas le cas des simples mutants).

5- Le potentiel de croissance ligneuse (buissons, arbres) existe chez toutes les Angiospermes mais ne s'exprime pas en conditions normales chez les espèces herbacées. La transformation d'une plante herbacée en plante ligneuse peut donc se manifester facilement et rapidement. L'ancêtre des Angiospermes présentait une croissance ligneuse et ce caractère a été réprimé au cours de l'évolution dans certaines lignées par des mutations dans des gènes tels que *FUL*, *SOC1* et *FT*...

6- On sait que le florigène est transmissible par des greffes et que la protéine FT fait partie du florigène. En greffant sur un arbre non transgénique une tige d'un arbre produisant une grande quantité de protéine FT (naturellement ou par transgénèse), on devrait pouvoir accélérer la floraison du porte-greffe sans avoir modifié son génome.

Programmées pour mourir...

Regulation and execution of molecular disassembly and catabolism during senescence. Marianne Hopkins, Catherine Taylor, Zhongda Liu, Fengshan Ma, Linda McNamara, Tzann-Wei Wang and John E. Thompson. *New Phytologist* 175: 201–214 (2007).

Senescence is a highly orchestrated developmental stage in the life cycle of plants. The onset of senescence is tightly controlled by signalling cascades that initiate changes in gene expression and the synthesis of new proteins.

Senescence occurs naturally at the end of the life span of an organ or, in the case of monocarpic senescence, the whole plant. It is induced by up-regulated expression of genes encoding proteins that are capable of implementing cell death. In as much as it is genetically regulated, the death of cells during senescence is classified as programmed cell death. One of the earliest physiological manifestations of senescence is membrane leakiness. In fact, the breakdown of cellular ultrastructure inherent in programmed cell death is, to a large extent, driven by the catabolism of macromolecules.

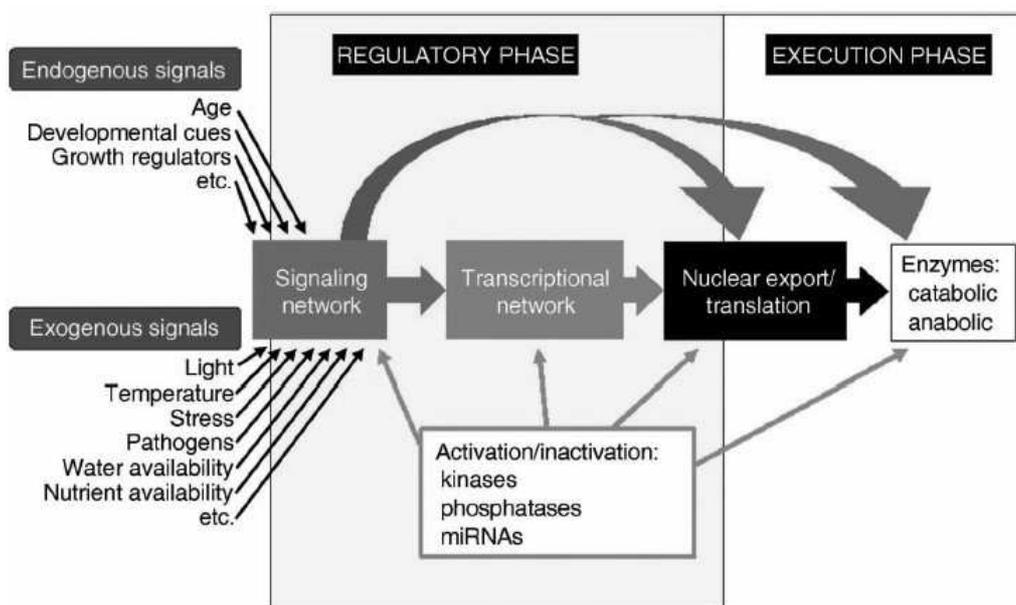


Fig. 1 Schematic illustration of the relationships between signalling and the regulation and execution of senescence.

Programmed cell death is also an inherent feature of xylogenesis and the hypersensitive response to incompatible pathogens. However, senescence occurs more slowly than, for example, the hypersensitive response induced during pathogenesis, which is acute and rapid. This is consistent with the fact that in senescing leaves programmed cell death is integrated with remobilization of carbon and nitrogen to developing seeds. For nutrient mobilization to be successful, the cells of the senescing tissue must remain viable, and hence it is only after this mobilization has been completed that total collapse of cell structure leading to death occurs.

Senescence is often described as the terminal phase of plant development, be it of a tissue, an organ or the entire plant. However, it is important to temper this notion of the terminal nature of senescence with the realization that senescence of one part of a plant is often essential for the ongoing development of other organs and tissues. Perhaps the

clearest example of this is leaf senescence and the attendant translocation of nutrients from the dying leaf tissue to developing seeds. Moreover, in nonmonocarpic species, the timing of senescence initiation for different tissues and organs appears to be developmentally regulated, and this has prompted use of the terminology “developmental senescence”.

Senescence is not observed in young leaves, indicating that repressors efficiently act to suppress cell degradation during early leaf development and/or that senescence activators are switched on when a leaf ages. Thus, massive regulatory network re-wiring likely constitutes an important component of the pre-senescence process. Transcription factors have been shown to be central elements of such regulatory networks.

(Transcription factors regulating leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. S. Balazadeh, D. M. Riano-Pachon, B. Mueller-Roeber. *Plant Biology* 10, 63–75 (2008).

Trifurcate Feed-Forward Regulation of Age-Dependent Cell Death Involving miR164 in *Arabidopsis*. Jin Hee Kim, Hye Ryun Woo, Jeongsik Kim, Pyung Ok Lim, In Chul Lee, Seung Hee Choi, Daehee Hwang, Hong Gil Nam. *Science* 323, 1053-1057 (2009).

The *Arabidopsis oresara1-1* (*ore1-1*, *oresara* means “long-living” in Korean) mutant was initially identified as a delayed leaf senescence mutant. We isolated and genetically analyzed the *ore1-2* allele in this study.

We examined age-associated characteristics in single leaves along their ages. Wild-type leaves showed a life span of ~36 days from their emergence (Fig. 1C). Delayed loss of chlorophyll content and of photochemical efficiency (Fv/Fm) with leaf aging was observed in *ore1* mutants. The expression of the *chlorophyll a/b-binding protein 2* (*CAB2*) gene and the cysteine protease-encoding *senescence-associated gene 12* (*SAG12*) exhibited delayed reduction and induction, respectively, with aging (Fig. 1D). We also found that aging-induced cell death was delayed in the *ore1* mutants, as shown by slower increases in membrane ion leakage of the leaves with aging (Fig. 1E).

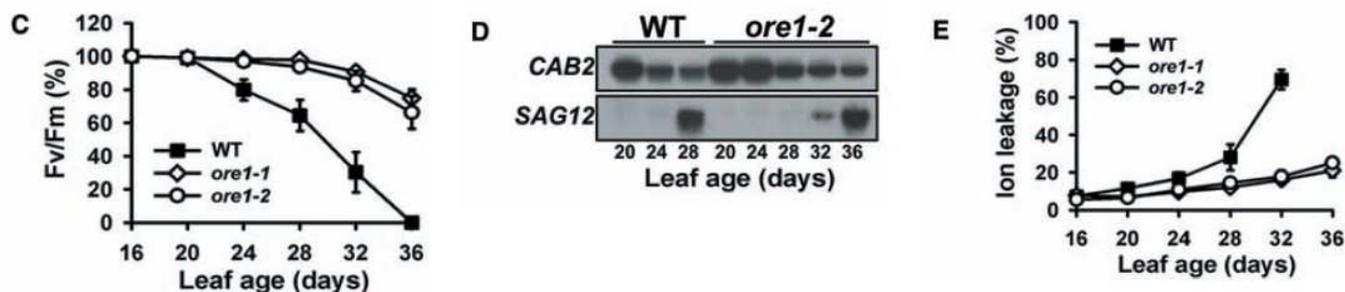


Fig. 1. Age-dependent cell death is delayed in the *ore1* mutants. Photochemical efficiency (Fv/Fm) of photosystem II (C), expression of *CAB2* and *SAG12* (D), membrane ion leakage (E).

Map-based cloning of the *ORE1* locus with the use of *ore1-2* revealed that the mutation was caused by a 5–base pair deletion in the gene of the transcription factor named *AtNAC2*. *AtNAC2* is part of the NAC family of transcription factors, that also includes *CUC*. The nuclear localization of *ORE1/AtNAC2* is consistent with its role as a transcription factor.

The *ORE1/AtNAC2* mRNA possesses a potential binding sequence for the small regulatory RNA named miR164. The miR164 represses the expression of a group of NAC family genes by cleaving the target mRNAs. We found that the amount of miR164 declined with leaf aging (Fig. 2A).

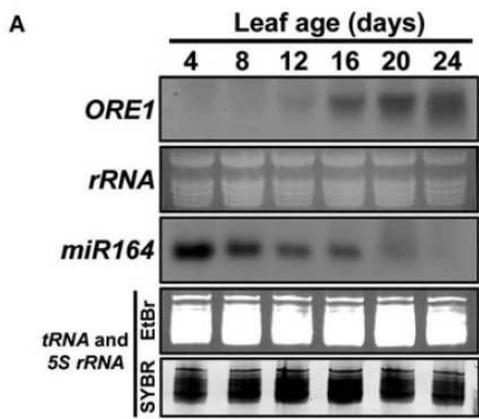


Fig. 2. *ORE1* mRNA is a target of miR164. (A) Expression pattern of *ORE1* and *miR164* with leaf aging. rRNA and tRNA and 5S rRNA, loading controls; EtBr, ethidium bromide stain; SYBR, SYBR gold stain

We examined the age-dependent miR164 expression in various delayed senescence mutants and identified *EIN2* as a putative regulator of miR164, based on the analysis of the *ein-34* mutant. The age-dependent regulation of *miR164* expression by *EIN2* was examined in detail at 4-day intervals (Fig. 4B). *miR164* expression was barely altered with aging in the *ein2-34* mutant as opposed to wild-type plants. The results indicate that *EIN2* mediates age-dependent down-regulation of miR164.

EIN2 is also known to be required for salt-induced expression of *ORE1/AtNAC2* in seedlings. We found that age-dependent induction of *ORE1* relies on *EIN2*, as the level of *ORE1* transcript in the *ein2-34* mutant was only 12% of that in the wild type in 28-day-old plants (Fig. 4C).

The functional relation between *ORE1* and *EIN2* in aging-induced leaf cell death was further examined using the *ore1-1/ein2-34* double mutant. In the double mutant, the loss of photochemical efficiency and the induction of *SAG12* expression exhibited a longer delay than did either of the single mutants (Fig. 4E). Therefore, *ore1-1* and *ein2-34* did not show a simple epistatic (“épistasique”) interaction but rather a partially additive effect.

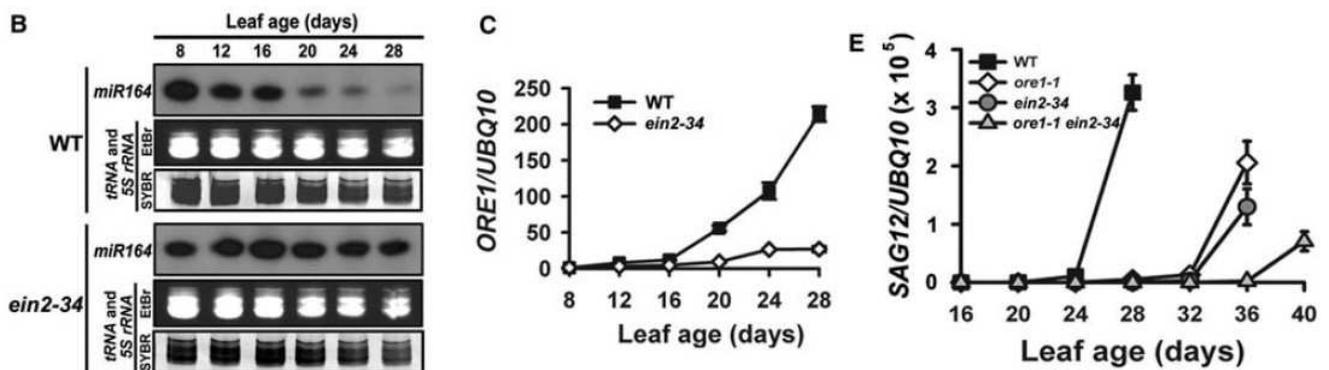


Fig. 4. (B) Age dependent expression of *miR164* in *ein2-34* leaves with aging. tRNA and 5S rRNA are loading controls. (C) Age-dependent expression level of *ORE1* mRNA in WT and *ein2-34* leaves. (E) Expression levels of *SAG12* of WT, *ore1-1*, *ein2-34*, and *ore1-1 ein2-34* leaves. *UBQ10*: *Ubiquitin10*.

Questions

Remarque importante: aucune des questions ne nécessite une réponse longue...

- 1- Quelle est la différence entre la sénescence dite « monocarpic » (monocarpique) et « nonmonocarpic » ?

- 2- Qu'est-ce qui induit la sénescence ?
- 3- La mort programmée des feuilles est-elle simplement une adaptation à la vie dans les régions où l'hiver est rigoureux ?
- 4- A quoi servent les gènes *CAB2* et *SAG12* dans cette étude ?
- 5- Comment arrive-t-on à la conclusion que *ORE1* est un activateur de *SAG12* (et vraisemblablement de plusieurs autres gènes de sénescence) ?
- 6- Quel est l'effet du miR164 sur l'expression de *ORE1* et sur la sénescence ?
- 7- Quel serait le phénotype d'une plante :
 - ne possédant pas de miR164 fonctionnel ?
 - surexprimant le miR164 ?
- 8- Quelles sont les deux façons (non exclusives) dont le gène *EIN2* pourrait contrôler l'expression de *ORE1* ? Croyez-vous que *EIN2* a un effet direct sur l'expression des gènes *SAG* ?
- 9- D'après vous, pourquoi les auteurs de l'étude ont-ils utilisé le gène d'ubiquitine10 (Figures 4C et 4E) ?
- 10- Que peut-on conclure de l'observation que l'effet des mutations *ore1-1* et *ein2-34* est additif ?
- 11- A partir de toutes les informations, représenter schématiquement un modèle de régulation de l'expression des gènes de sénescence par *EIN2*, *miR164* et *ORE1*. Quelle est la fonction du miR164 dans ce système ?
- 12- Même chez le double mutant *ore1-1/ein2-34* la sénescence n'est que retardée et pas annulée. Pourquoi ? (la vie éternelle est-elle vraiment impossible ?)
- 13- Le titre de l'article (« Trifurcate feed-forward... ») est incompréhensible et repose sur une modélisation mathématique du système (non présentée ici). Proposez un autre titre (en français ou en anglais) pour cet article.

Corrigé :

- 1- La sénescence monocarpique est la mort de toute la plante alors que la sénescence non monocarpique représente la mort d'un tissu ou organe dans une phase précise de développement.
- 2- Plusieurs facteurs internes (âge, développement, hormones...) et externes (lumière, température, stress, infections...) contribuent à induire le programme génétique menant à la sénescence. Comme pour la floraison, la plante reçoit donc plusieurs signaux qui peuvent être contradictoires et doit les intégrer pour faire le choix d'entrer ou non en sénescence.
- 3- Non. Il peut s'agir d'utiliser les réserves de la feuille pour nourrir une autre partie de la plante (les graines, par exemple). Cela peut aussi être une réponse à un pathogène.
- 4- Les gènes *CAB2* et *SAG12* servent de **marqueurs de développement**. L'expression de *CAB2* est associée à des feuilles saines, en croissance, alors que l'expression de *SAG12* est représentative de la phase de sénescence.
- 5- Les figures 1D et 4E montrent que l'expression de *SAG12* est retardée chez le mutant *ore1*. D'autre part, la sénescence est retardée chez le mutant : efficacité de photosynthèse (figure 1C) et « fuite d'ions » (figure 1E). Il est donc probable que *ORE1* induise tout le programme génétique de sénescence.
- 6- Le miR164 a un effet négatif sur l'expression de *ORE1*, et donc sur la sénescence (question 5). Ceci est démontré par :
 - la présence d'une séquence complémentaire au miR164 sur l'ARNm de *ORE1* ;
 - la corrélation inverse entre l'expression de *miR164* et de *ORE1* (figure 2A) ;

- le maintien de l'expression de *miR164* chez le mutant *ein2*, dont la sénescence est retardée (figure 4B) ;
- l'expression plus faible de *ORE1* chez le mutant *ein2* (figure 4C)

7- En absence de *miR164*, il n'y aurait pas d'inhibition de l'expression de *ORE1* chez les feuilles jeunes : la sénescence serait accélérée. A l'inverse, la surexpression de *miR164* provoquerait une plus forte inhibition de la transcription de *ORE1* et ainsi un retard de la sénescence.

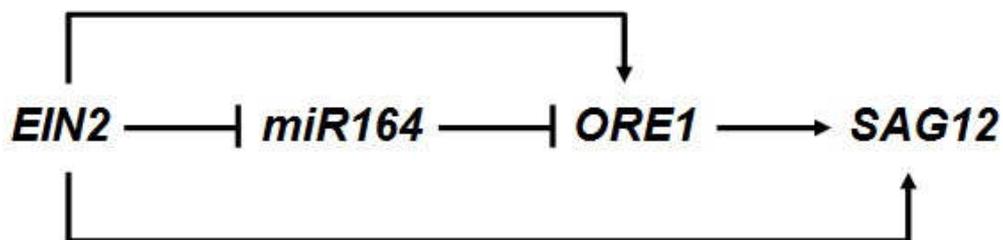
- 8- 1) indirectement, en régulant l'expression du gène codant le *miR164* : effet positif (inhibition d'un inhibiteur)
- 2) directement, en régulant l'expression du gène *ORE1* (effet sur le promoteur de *ORE1*).

Si *EIN2* ne contrôlait l'expression de *SAG12* que par l'intermédiaire de *ORE1*, il n'y aurait pas de différence entre le mutant *ein2* et le double mutant *ein2/ore1* pour l'expression de *SAG12*. Or, chez le double mutant, l'expression de *SAG12* est encore plus retardée que chez *ore1*, ce qui tend à démontrer que *EIN2* influence aussi *SAG12* indépendamment de *ORE1*.

9- Le gène *UBQ10* a une expression constitutive. Il sert donc de référence pour déterminer les niveaux d'expression relative des gènes d'intérêt.

10- Un effet additif indique que les deux gènes n'agissent pas sur une même voie (ou du moins, pas entièrement sur une même voie) car dans ce cas il y aurait phénomène d'épistasie.

11-



Le *miR164* assure la régulation de la sénescence dans le développement, empêchant celle-ci de se mettre en place dans les feuilles encore jeunes.

12- Il est probable que d'autres gènes peuvent aussi induire la sénescence.

13- Par exemple : « Arabidopsis age-dependant cell death is regulated by a network of genes, including *miR164* ».