

"Existe-t-il un lien fonctionnel entre la protéine TERMINAL FLOWER 1 et les peroxysomes ?"

Auteur : Yilmaz, Tugba

Promoteur(s) : Perilleux, Claire

Faculté : Faculté des Sciences

Diplôme : Master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire, à finalité approfondie

Année académique : 2019-2020

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/9895>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

Université de Liège
Département des Sciences de la Vie Faculté
des Sciences
Laboratoire de Physiologie végétale



Existe-t-il un lien fonctionnel entre la protéine TERMINAL FLOWER 1 et les peroxysomes ?

Mémoire présenté par

Tugba YILMAZ

En vue de l'obtention du grade de

Master en Biochimie, Biologie moléculaire et cellulaire à finalité approfondie

Promoteur : Pr. Claire Périlleux

Septembre, Année académique 2019-2020

« Existe-t-il un lien fonctionnel entre la protéine TERMINAL FLOWER1 et les peroxyosomes ? »

Résumé du mémoire présenté par Tugba Yilmaz, Master BBMC, 2019-2020
Promoteur : Prof. C. Périlleux, Laboratoire de Physiologie végétale

La floraison est une étape importante du cycle de développement des plantes angiospermes et est régulée par l'intégration de signaux endogènes et environnementaux. La protéine TERMINAL FLOWER 1 (TFL1) est un répresseur majeur de la floraison : elle agit au sein des méristèmes de tiges afin de réprimer la différenciation des cellules souches en structure florale. TFL1 a fait l'objet d'études préalables au sein du laboratoire de Physiologie végétale. Des interacteurs potentiels de la protéine ont été recherchés chez *Arabidopsis* et plusieurs protéines du peroxyosome intervenant dans la β -oxydation des lipides, la gestion du stress oxydatif ou encore la biosynthèse de l'auxine, ont été identifiées.

L'objectif de ce mémoire a été d'étudier l'existence d'un lien possible entre TFL1 et le métabolisme du peroxyosome chez *Arabidopsis*, en particulier la biosynthèse d'auxine et le stress oxydatif.

Dans un premier temps, la sensibilité du mutant *tfl1* et du surexprimeur *35S:TFL1* au précurseur d'auxine IBA a été analysée. Nous avons constaté que la réponse biologique à l'IBA ne semble pas être affectée par la perte de fonction ou la surexpression de *TFL1*.

Dans un second temps, l'analyse transcriptomique du mutant *tfl1* préalablement réalisée dans le laboratoire de Physiologie végétale a été exploitée. La liste des gènes différentiellement exprimés (DEG) détectés dans les parties aériennes et les racines a été examinée. Il a été constaté qu'un certain nombre de gènes intervenant dans les fonctions métaboliques du peroxyosome étaient affectés par la mutation *tfl1* suggérant que celle-ci altère les fonctions du peroxyosome. Ensuite, les données obtenues par l'analyse transcriptomique du mutant *tfl1* ont été croisées avec une méta-analyse dont l'objectif était de caractériser la signature transcriptomique du stress oxydatif. Nous avons constaté l'enrichissement de certains « clusters de gènes » dans le transcriptome du mutant *tfl1*. Dans les parties aériennes, un nombre important de DEG sont des gènes identifiés suite à un stress généré par de fortes intensités lumineuses, suggérant que la sensibilité à la lumière du mutant *tfl1* serait différente du WT. De plus, de nombreux DEG sont communs aux mutants *tfl1* et *rboh1* déficient dans une NADPH oxydase de la membrane plasmique, suggérant que la fonction de *TFL1* pourrait s'exercer en partie via *RBOH* (*F* et/ou *D*). De manière assez surprenante, les DEG détectés dans les racines du mutant *tfl1* sont enrichis dans un cluster détecté dans le mutant *gun1*, affecté dans la signalisation rétrograde des plastides, et semblent indiquer une dérégulation des gènes nécessaires à l'activité photosynthétique.

Le travail réalisé au cours de ce mémoire n'a pas permis de préciser un lien clair entre TFL1 et les fonctions du peroxyosomes. Cependant, l'analyse du transcriptome du mutant *tfl1* a permis de mettre en évidence un lien possible entre TFL1 et divers processus cellulaires liés au stress oxydatif.

Remerciements

Au terme de ce mémoire, je voudrais adresser mes remerciements à l'ensemble des personnes qui m'ont aidé tout au long de sa réalisation.

J'adresse tout d'abord mes remerciements au Professeur Claire PÉRILLEUX pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour m'avoir permis d'y réaliser mon mémoire. Je la remercie particulièrement pour son aide ainsi que pour ses conseils, sa disponibilité et sa bienveillance tout au long de ce mémoire.

Je remercie chaleureusement Fred et Sam, pour leurs aides précieuses qu'ils m'ont apporté dans certaines parties de ce travail. Merci pour vos bons conseils, recommandations et explications.

Un grand merci à Nath' pour m'avoir guider et conseiller lors des expériences. Merci pour ta patience, ta disponibilité, et tes explications.

Je tiens également à remercier toute l'équipe du laboratoire de Physiologie végétale. Malgré la courte durée passée ensemble à cause du Covid-19, ce fut un réel plaisir de travailler au sein de cette équipe.

Un grand merci à mes proches et ma famille qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de mes études.

Merci à Samira, Fadoua, Buket et Meryem pour leur soutien et encouragements.

Je remercie tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail

Table des matières

ABRÉVIATIONS

INTRODUCTION	1
1. CHAPITRE I : RELEVÉ DE LA LITTÉRATURE	2
1.1. <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	2
1.2. LA FLORAISON	3
1.3. FT, TFL1 ET LES PEBPS	6
1.3.1. <i>FT et les stomates</i>	10
1.3.2. <i>TFL1 et les racines</i>	10
1.4. LES PEROXYSOMES	11
2. CHAPITRE II: EXPÉRIENCES PRÉLIMINAIRES	21
2.1. MÉTABOLISME DE L'AUXINE	21
2.2. ANALYSE DU TRANSCRIPTOME DU MUTANT <i>TFL1</i>	23
3. CHAPITRE III : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	42
4. BIBLIOGRAPHIE.....	45
5. ANNEXE	54

Abréviations

2-PG : 2-phosphoglycolate

3-PGA : 3-phosphoglycerate

ACS : Acetyl-Coenzyme A synthetase

ACX : Acetyl-CoA oxydase

AIA : Acide indole 3-acétique

AIM1 : ABNORMAL INFLORESCENCE MERISTEM1

AP1 : APETALA1

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

CAT : CATALASE

CO : CONSTANS

CoA : Coenzyme A

Col : Columbia

DEG : Gènes différenciellement exprimés

FLC : FLOWERING LOCUS C

FT : FLOWERING LOCUS T

GI : GIGANTEA

IBA : INDOLE-3- BUTYRIC ACID

IBR3 : INDOLE-3-BUTYRIC ACID RESPONSE3

JAZ : Jasmonate-zim-domain protein

KAT : Acétyl-coenzyme A acetyltransferase/ thiolase

LFY : LEAFY

MFP : MULTIFUNCTIONAL PROTEIN

MS : Murashige et Skoog

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide

ND : non détecté

NOT-DEG : gène non différenciellement exprimé

OXS3 : OXIDATIVE STRESS 3

PEBP : Phosphatidylethanolamine binding protein

PEX : Peroxine

POX : Peroxidase

PTS : Peroxisome transfer signal

RBOHD : RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG PROTEIN D

RBOHF : RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG PROTEIN F

RNA : Ribonucleic acid

RNS : Reactive nitrogen species

ROS : Reactive oxygen species

RSS : Reactive sulfur species

SOC1 : SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO

TFL1 : TERMINAL FLOWER 1

WT : Wild-type

Introduction

La floraison est une étape cruciale et précisément régulée dans le temps afin d'assurer le succès de la reproduction sexuée chez les plantes. L'induction de la floraison dépend de divers facteurs environnementaux et endogènes interagissant avec un réseau complexe de gènes. A l'heure actuelle, plus de 300 gènes régulant la floraison ont été identifiés chez *Arabidopsis thaliana*. Les protéines FLOWERING LOCUS T (FT) et TERMINAL FLOWER 1 (TFL1) sont des acteurs majeurs de la floraison. Bien qu'appartenant à une même famille de protéines, elles exercent des fonctions antagonistes : FT est une protéine systémique qui induit la floraison, tandis que TFL1 est une protéine qui agit au sein des méristèmes de tiges afin de réprimer la différenciation des cellules souches en structure florale.

Un des sujets de recherche principaux au sein du laboratoire de Physiologie végétale est de comprendre par quels mécanismes les protéines FT et TFL1 exercent leurs fonctions antagonistes sur la floraison. Des analyses par pulldowns ont été réalisées afin d'identifier des protéines partenaires. Pour ce faire, des lignées transgéniques surexprimant les protéines taguées ont été utilisées pour isoler, par copurification d'affinité, les complexes formés *in vivo*. L'analyse de ces complexes par spectrométrie de masse a permis d'identifier un petit nombre d'interacteurs potentiels des protéines FT et TFL1. De manière assez inattendue, plusieurs protéines du peroxysome ont été identifiées parmi les protéines copurifiées avec TFL1 : ABNORMAL INFLORESCENCE 1 (AIM1) et MULTIFUNCTIONAL PROTEIN2 (MFP2) intervenant dans la β -oxydation des lipides, CATALASE2 (CAT2) jouant un rôle dans la gestion du stress oxydatif ou encore INDOLE-3-BUTYRIC ACID RESPONSE3 (IBR3) intervenant dans la biosynthèse de l'auxine.

Le but de ce travail est dès lors d'investiguer un lien possible entre TFL1 et le métabolisme du peroxysome, en particulier la biosynthèse d'auxine et le stress oxydatif.

Pour la première partie, nous avons pu réaliser quelques expériences visant à évaluer la sensibilité du mutant *tfl1* au précurseur d'auxine IBA. Pour la seconde partie, nous avons exploité une analyse transcriptomique du mutant *tfl1* préalablement réalisée dans le laboratoire de Physiologie végétale pour examiner l'expression de gènes liés au stress oxydatif.

1. CHAPITRE I : Relevé de la littérature

1.1. Arabidopsis thaliana

Aussi appelée Arabette des dames, *Arabidopsis thaliana*, utilisée comme organisme modèle dans les études de biologie végétale, est une plante appartenant à la famille des Brassicacées (Kaul *et al.*, 2000 ; Meinke *et al.*, 1998). Il s'agit d'une plante annuelle pouvant atteindre une hauteur de 20 à 25 cm. Une rosette de feuilles est formée à sa base, dont se détache une hampe florale portant une inflorescence. D'autres inflorescences se forment sur les axes secondaires issus du développement des bourgeons axillaires. Les inflorescences sont des grappes indéterminées, qui portent des fleurs blanches, constituées de 4 sépales et 4 pétales disposés en croix, 4 étamines et un pistil. *A. thaliana* possède la capacité de s'autoféconder. Les fleurs donneront les siliques contenant chacune une cinquantaine de graines en moyenne. Plusieurs écotypes d'*A. thaliana*, présents naturellement en Europe, Asie, Afrique du Nord, Amérique du Nord et Australie, sont disponibles. Les écotypes Columbia et Landsberg sont les plus utilisés dans le cadre d'études génétiques et moléculaires car leur cycle de développement est particulièrement rapide.

Bien que cette espèce n'ait aucun intérêt économique, les raisons pour lesquelles *A. thaliana* est devenue un outil largement utilisé en biologie végétale sont multiples (Kaul *et al.*, 2000 ; Meinke *et al.*, 1998). Le génome de cette herbacée, entièrement séquencé en 2000, contient 157 millions de paires de bases (25 498 gènes) réparties en 5 chromosomes. Il s'agit donc d'un génome relativement petit, qui peut être aisément manipulé par génie génétique. De plus, il contient peu de séquences répétées. *A. thaliana* possède un cycle de développement court. Son cycle de vie, de la graine à la graine, est d'environ 6 semaines si la lumière, la température et les autres facteurs de croissance ne sont pas limitants. De plus, la culture et la manipulation d'*Arabidopsis* sont aisées. En effet, ses besoins en espace sont limités, vu sa taille, et elle peut être cultivée dans une serre ou une chambre de croissance en intérieur. Par ailleurs, l'absence d'intérêt économique facilite l'échange de données entre équipes de recherche.

1.2. La floraison

La floraison représente la transition du stade végétatif au stade reproducteur ; il s'agit d'une étape très importante dans le cycle de vie des plantes angiospermes. Le moment de la transition florale est donc critique et chaque espèce végétale a développé des systèmes de régulation pour l'optimiser.

L'enclenchement de la floraison dépend de l'intégration de signaux endogènes et de signaux environnementaux tels que la lumière et la température (Bernier et Périlleux, 2005 ; Bouché *et al.*, 2016 ; Putterill *et al.*, 2004). Il y a environ un siècle, il a été observé que les plantes perçoivent les variations saisonnières et les changements de la durée du jour (photopériodisme). Il a été démontré que le signal issu de la photopériode, appelé florigène, circule des feuilles, où il est synthétisé, aux méristèmes de tige, où les fleurs sont initiées. Les scientifiques ont pu, dans les années 2000, déterminer la nature du florigène, soit la protéine FT à laquelle nous reviendrons plus loin.

La température joue également un rôle important dans l'induction de la floraison. En particulier chez les espèces qui ont besoin d'une exposition prolongée au froid, la vernalisation, pour fleurir après l'hiver. La durée de cette période de froid peut varier en fonction des espèces végétales.

D'autres signaux environnementaux peuvent influencer la floraison, comme la disponibilité en nutriments, la température, la qualité de la lumière, les stress biotiques et abiotiques. Toutefois, ces signaux ont généralement un impact mineur sur la floraison. En plus de ces facteurs environnementaux, des signaux endogènes jouent un rôle important dans la floraison, comme des phytohormones telles que les gibbérellines, ou encore l'acide abscissique.

La floraison chez *Arabidopsis thaliana*

De nombreux gènes impliqués dans la floraison d'*A. thaliana* ont été identifiés depuis les années 1980. La floraison au sens large peut être divisée en trois phases successives : la transition florale, qui représente le changement de phase de développement, l'initiation des méristèmes floraux et enfin le développement des organes floraux jusqu'à l'ouverture des fleurs (Bernier et Périlleux, 2005 ; Corbesier et Coupland, 2006 ; Putterill *et al.*, 2004).

Ces trois étapes sont régulées par des gènes différents qui agissent en cascade : 1) les différentes voies d'induction de la floraison par des facteurs environnementaux ou endogènes régulent les gènes de la transition florale dits « intégrateurs » ; 2) ces gènes activent dans le méristème de tige les gènes d'identité des méristèmes floraux ; 3) ceux-ci activent les gènes des organes floraux afin de permettre la formation de la fleur et en particulier des organes reproducteurs.

Initialement, quatre cascades d'activation de la floraison ont pu être mises en évidence chez *Arabidopsis*, de même que l'existence de gènes ayant un rôle de répresseur. Cette complexité traduit un réseau génétique robuste et efficace.

Les quatre grandes voies de signalisation correspondent aux voies dites « de la vernalisation », « de la photopériode », « des gibbérellines » et à « la voie autonome » (Bernier et Périlleux, 2005 ; Irish, 2010 ; Putterill *et al.*, 2004) (Figure 1). La finalité de ces quatre voies de signalisation est la régulation d'un ensemble de gènes communs, appelés « intégrateurs » parmi lesquels le gène *FT* qui code pour le florigène dans les feuilles, et des gènes activés très précocement dans le méristème en transition florale : *FD*, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO* (*SOC1*) et *LEAFY* (*LFY*). Ce dernier et le gène *APETALA1* (*API*) sont des gènes d'identité des méristèmes floraux : leur expression est nécessaire et suffisante pour l'initiation des fleurs. L'activation de *LFY* et *API* doit être réprimée dans les méristèmes qui ne forment pas directement une fleur, par exemple dans la zone centrale du méristème inflorescentiel d'*A. thaliana*. C'est la fonction du gène *TERMINAL FLOWER 1* (*TFL1*), qui agit de manière antagoniste à *FT*, comme nous y reviendrons plus loin.

Un ensemble de gènes inhibant la transition florale ont également été découverts chez *A. thaliana*, parmi lesquels *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) est le principal répresseur de la floraison (Michaels et Amaniso, 1999). Il s'agit d'un gène codant pour un facteur de transcription à boîte MADS. *FLC* réprime *FT*, *FD*, *SOC1*, et le gène *LFY* (Searle *et al.*, 2006). Nous retrouvons d'autres facteurs intervenant dans la répression de la floraison tels que *SHORT VEGETATIVE PHASE* (*SVP*) (Mateos *et al.*, 2015).

Les quatre voies d'induction de la floraison

La voie de la vernalisation

Dans les écotypes d'*A. thaliana* ayant besoin de vernalisation, le niveau d'expression du répresseur *FLC* est élevé avant toute exposition au froid, réprimant ainsi *SOC1*, *FT* et *FD* (Amasino *et al.*, 2010 ; Sung *et al.*, 2004). Lors de l'exposition au froid de l'hiver, *FLC* est réprimé au moyen de modifications épigénétiques (Amasino, 2004). Ainsi, à la sortie de l'hiver, le faible niveau d'expression de *FLC* ne peut plus s'opposer à l'action des intégrateurs floraux : la floraison peut alors avoir lieu.

La voie de la photopériode

La voie d'induction de la floraison par la photopériode est une voie importante. Elle représente la capacité de la plante à distinguer si les jours sont longs ou courts.

L'acteur central de cette voie est *CONSTANS* (*CO*). *CO* est régulé à deux niveaux : au niveau transcriptionnel, le niveau d'ARNm est contrôlé par l'horloge circadienne via *GIGANTEA* (*GI*), et au niveau post-traductionnel, la protéine *CO* est stabilisée à la lumière (Putterill *et al.*, 2004 ; Valverde *et al.*, 2004). Dans le cas des plantes de jours longs, dont *A. thaliana* fait partie, ce n'est que si la lumière coïncide avec le moment où les ARNm sont présents, soit en fin de journée, que la protéine *CO* est stabilisée et va pouvoir transmettre le signal activateur de la floraison via l'induction de l'expression de *FT*. La protéine *FT*, synthétisée dans les feuilles, est ensuite transportée au niveau du méristème apical de tige via le phloème et interagit avec le facteur de transcription *FD*, via une protéine 14-3-3, pour former un complexe d'activation dont une cible directe est le gène *API* (Abe *et al.*, 2005; Taoka *et al.*, 2011 ; Wigge *et al.*, 2005). *CO* active aussi *SOC1*, qui est lui-même un activateur de *LFY* (Yoo *et al.*, 2005).

La voie autonome

La voie autonome est une voie de signalisation qui regroupe un ensemble de gènes qui ont pour but de réprimer l'expression de *FLC*. Cette voie est dite autonome car elle agit indépendamment des facteurs environnementaux (Bernier et Périlleux, 2005).

La voie des gibbérellines

Les gibbérellines peuvent induire la floraison par l'activation de *SOC1* et de *LFY* dans les méristèmes de tige (Bernier et Périlleux, 2005). La voie des gibbérellines comprend un ensemble de gènes impliqués dans la biosynthèse des gibbérellines et des gènes de la voie de signalisation de ces hormones.

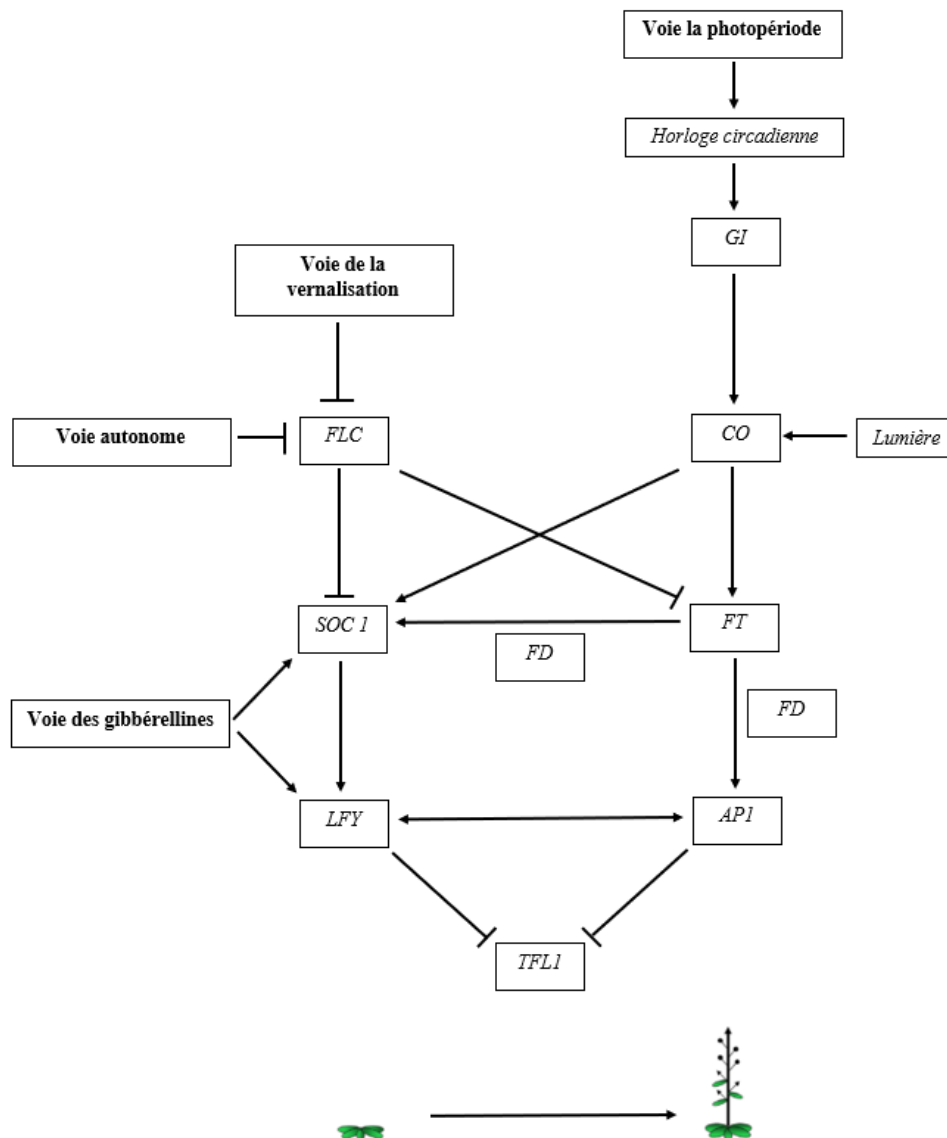


Figure 1 : Les quatre voies principales d'induction de la floraison.

1.3. FT, TFL1 et les PEBPs

Les protéines FT et TFL1 appartiennent à la famille des protéines de liaison à la phosphatidyléthanolamine (PEBP) (Kobayashi *et al.*, 1999). Cette famille, chez *A. thaliana*, est constituée de trois sous-familles : la sous-famille de FT, la sous-famille de TFL1 et la sous-

famille de *MOTHER OF FT and TFL1 (MFT)* (Liu *et al.*, 2016). Au sein de la sous-famille *FT*, nous retrouvons *FT* et *TWIN SISTER OF FT (TSF)* qui sont des gènes impliqués dans la promotion de la floraison. *TFL1*, *BROTHER OF FT AND TFL1 (BFT)* et *ARABIDOPSIS THALIANA CENTRORADIALIS HOMOLOG (ATC)*, interviennent dans la répression de la floraison et appartiennent à la sous-famille de type *TFL1*. Tandis que *MFT*, appartenant à la sous-famille de type *MFT*, est impliqué dans la régulation de la germination des graines. En somme, la famille des PEBP comporte six gènes jouant un rôle clé dans le développement de la plante.

TFL1 et *FT* sont des acteurs clés dans la floraison et le développement des inflorescences. Malgré un degré de similitude élevé au niveau de leur séquence, ces deux protéines possèdent des fonctions antagonistes (Hanzawa *et al.*, 2005 ; Conti et Bradley, 2007). *FT*, synthétisée dans les feuilles puis transportée au niveau du méristème apical via le phloème, favorise la floraison. Tandis que *TFL1*, exprimée dans la région centrale du méristème apical, est un régulateur négatif de la floraison.

Durant la phase végétative d'*Arabidopsis* de type sauvage, *TFL1* est faiblement exprimé au centre du méristème (Alvarez *et al.*, 1992; Schultz et Haughn, 1993 ; Shannon et Meeks-Wagner, 1991). Son expression augmente au sein du méristème apical après la transition florale afin de maintenir le méristème inflorescentiel indéterminé. *TFL1* agit comme un signal contrôlant l'identité du méristème de l'inflorescence : d'une part, il retarde la floraison et d'autre part, il empêche la formation d'une fleur terminale (Bradley *et al.*, 1997).

Malgré que l'expression de *TFL1* soit limitée aux cellules internes du méristème apical, la protéine agit au-delà de son domaine d'expression (Bradley *et al.*, 1997 ; Conti et Bradley, 2007 ; Liljegren *et al.*, 1999). En effet, *TFL1* possède la particularité de se déplacer des cellules internes vers les cellules externes du méristème de tige tout en restant hors des méristèmes floraux (Conti et Bradley, 2007 ; Liljegren *et al.*, 1999). La transition des primordiums foliaires en méristèmes floraux au niveau latéral du méristème de tige est rendue possible par l'action coopérative des gènes d'identité des méristèmes floraux (*LFY* et *API*) et de *TFL1* (Figure 2). Dans les méristèmes floraux, *LFY* est un régulateur positif d'*API*. Ce dernier peut, à son tour, réguler positivement l'expression de *LFY*. Ainsi, nous observons une boucle de contrôle positive entre *API* et *LFY* permettant l'initiation de fleurs. L'expression de *LFY* et *API* est

limitée au niveau des méristèmes floraux car *TFL1*, exprimé au centre du méristème de tige, est un régulateur négatif de ces deux gènes.

La mutation de *TFL1* affecte le développement du méristème de l'inflorescence. En effet, le mutant *tfl1* possède la particularité d'avoir une phase végétative plus courte qu'une plante sauvage (Schultz et Haughn, 1993 ; Shannon et Meeks-Wagner, 1991). Ainsi, les plantes mutantes *tfl1* fleurissent plus tôt que le type sauvage, avec une réduction du nombre de feuilles et de branches produites sur la tige principale (Figure 2). De plus, la mutation de *TFL1* provoque la transition d'une inflorescence indéterminée à un type déterminé générant une fleur terminale.

La surexpression de *TFL1*, au contraire, provoque une floraison tardive et empêche la transition des méristèmes d'inflorescence en méristèmes floraux en inhibant les gènes d'identité des méristèmes floraux *LFY* et *AP1* (Ratcliffe *et al.*, 1998, 1999) (Figure 2).

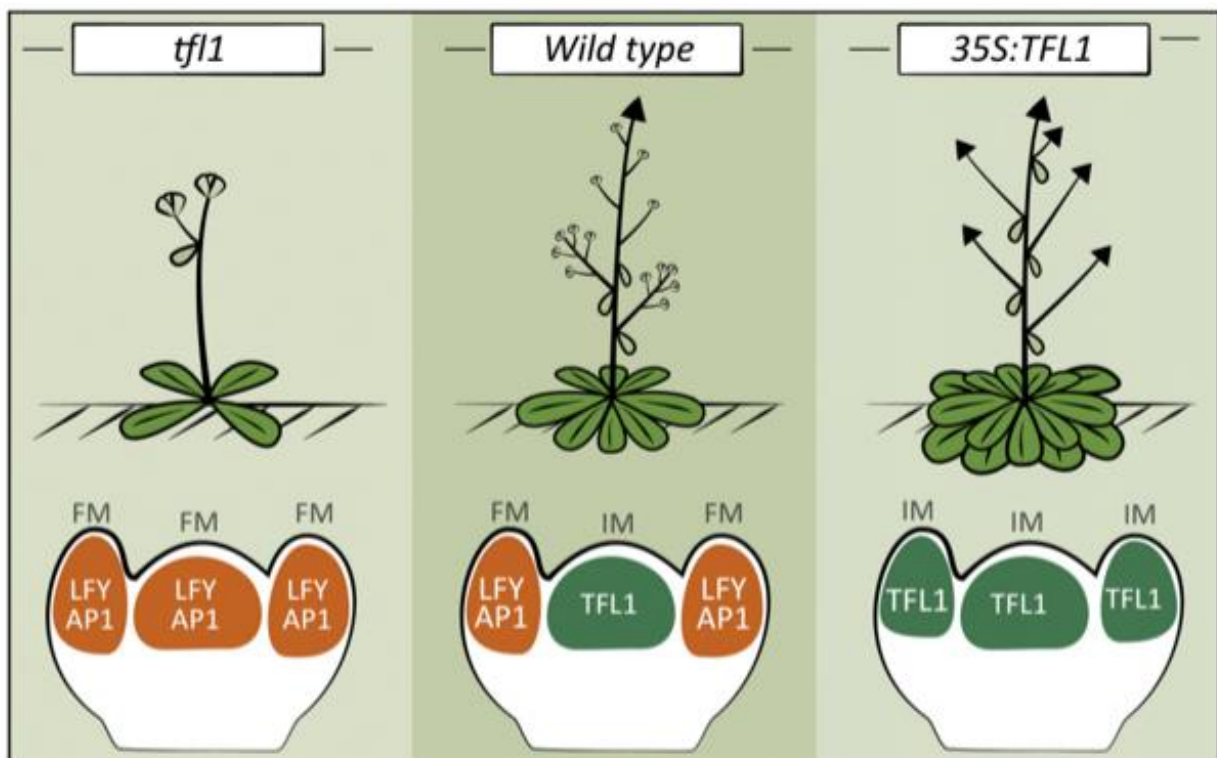


Figure 2 : Schéma de l'impact de l'expression de *TFL1* chez *A. thaliana*
(Périlleux *et al.* 2019)

Chez la plante sauvage (Wild type), *TFL1* (vert) est exprimé au sein du méristème d'inflorescence tandis que l'expression de *LFY* et de *AP1* (orange) est restreinte aux méristèmes floraux. Chez le mutant *tfl1*, *LFY* et *AP1* sont exprimés au sein du méristème d'inflorescence et des méristèmes floraux

conduisant à un phénotype de floraison précoce et à la formation d'une fleur terminale. Chez le surexprimeur de TFL1, TFL1 est exprimé au sein des méristèmes floraux retardant ainsi la floraison.

Par conséquent, la balance FT/TFL1 module l'architecture de la plante. Il a été suggéré que le niveau d'expression de *TFL1* doit augmenter proportionnellement au niveau d'expression de *FT* afin de maintenir un certain nombre de cellules souches au sein du méristème (Conti et Bradley, 2007 ; Jaeger *et al.*, 2013 ; Périlleux *et al.*, 2019). En effet, *TFL1* et les gènes d'identité des méristèmes floraux sont exprimés dans des domaines distincts du méristème. Alors que *TFL1* est exprimé au centre du méristème apical, *LFY* et *AP1* sont exprimés au sein des méristèmes latéraux initiés sur le flanc du méristème d'inflorescence et produisant des fleurs. Il est important de noter que *LFY* et *AP1* contrôlent l'expression de *TFL1* en formant une boucle de contrôle. *LFY* agirait comme activateur de *TFL1*. *AP1*, formant un complexe de protéines MADS-box avec *SOC1*, *AGAMOUS LIKE 24 (AGL24)* et *SVP*, agirait comme répresseur de l'expression de *TFL1* en bloquant sa transcription.

La manière dont FT et TFL1 exercent leurs rôles antagonistes n'est pas encore élucidée (Jaeger *et al.*, 2013 ; Périlleux *et al.*, 2019 ; Seranno-Mislata *et al.*, 2016). Chez *A.thaliana*, il a été démontré qu'une interaction physique existe entre TFL1 et FD (Conti et Bradley, 2007 ; Hanano et Goto, 2011 ; Périlleux *et al.*, 2019). De plus, la mutation de *FD* annule le phénotype de floraison tardive chez le surexprimeur de *TFL1*. Ces résultats évoquent deux possibilités : soit TFL1 est en compétition avec FT pour se lier à FD, soit les complexes TFL1-FD (inhibiteur) et FT-FD (activateur) régulent de manière opposée les gènes de floraison. Suite à diverses observations, l'hypothèse que TFL1 agirait en réprimant au niveau transcriptionnel les mêmes gènes cibles que FT a été émise. TFL1 étant exprimé au sein des méristèmes et ne se déplaçant que sur des courtes distances, la compétition potentielle entre FT et TFL1 se produirait au sein de ceux-ci. Cependant, l'étude d'un mutant où *TFL1* est exprimé dans le système vasculaire de manière ectopique laisse penser que la compétition entre FT et TFL1 aurait lieu en amont de FD au niveau de la partie aérienne. En effet, TFL1 est détecté au sein du système vasculaire de la tige. A l'heure actuelle, la question de savoir comment FT et TFL1 exercent leur fonction reste un point d'interrogation.

Les effets pléiotropiques de FT et TFL1

FT et TFL1, en plus d'être des acteurs clés dans la floraison, interviennent également au niveau d'autres fonctions (Liu *et al.*, 2016).

1.3.1. FT et les stomates

Les stomates jouent un rôle primordial dans les échanges gazeux entre la plante et l'atmosphère en laissant entrer le CO₂ nécessaire à la photosynthèse, et en laissant sortir l'O₂ et la vapeur d'eau (Inoue et Kinoshita, 2017 ; Kinoshita et Shimazaki 1999). L'ouverture et la fermeture des stomates sont régulées par divers signaux environnementaux tels que la lumière, le CO₂, et la température. Leur ouverture est notamment médiée par les phototropines (phot1 et phot2). Ceux-ci sont des photorécepteurs de la lumière bleue et ont pour fonction d'activer la H⁺/ATPase de la membrane plasmique permettant ainsi l'ouverture des stomates.

Diverses études ont permis de mettre en évidence la présence d'ARNm de différents acteurs de la floraison tels que *FT*, *CO*, *TSF* et *SOC1*, dans les cellules de garde (Aoki *et al.*, 2019 ; Kinoshita *et al.*, 2011). Ceux-ci réguleraient positivement l'ouverture des stomates. Il a été mis en évidence que FT est impliqué dans la régulation de la H⁺/ATPase par la lumière bleue au sein des cellules de garde. De plus, une étude récente a pu mettre en évidence la régulation de l'ouverture des stomates d'*A. thaliana* par la photopériode et la modification épigénétique de l'histone 3 (triméthylation H3K4) au locus de *SOC1* et que cette régulation dépend de FT (Kinoshita *et al.*, 2011). Toutefois, la manière dont FT induirait la triméthylation de H3K4 de *SOC1* reste un mystère et nécessite des recherches supplémentaires.

1.3.2. TFL1 et les racines

TFL1 est aussi exprimé dans les racines, et son niveau d'expression augmente dans ces organes au cours de la transition florale (Bouché *et al.*, 2016). Jennifer Lachowiec et son groupe ont réalisé une étude d'association pangénomique (Genome-Wide Association Study : GWAS) chez *A.thaliana* permettant d'identifier au sein du génome des polymorphismes génétiques associés à des variations phénotypiques (Lachowiec *et al.*, 2015). Cette étude a mis en évidence que le mutant *tfl1* présente des racines plus longues que le sauvage concluant que *TFL1* agirait comme un répresseur de la croissance racinaire.

1.4. Les peroxysomes

Les peroxysomes sont des organites présents au sein du cytoplasme des cellules eucaryotes. Délimités par une membrane lipidique simple, ces organites présentent une structure sphérique dont le diamètre varie entre 0,1 et 1 μm mais peut aller jusqu'à 1,7 μm chez les végétaux (Hu *et al.*, 2012).

En ce qui concerne leur biogenèse, les peroxysomes se forment à partir d'un sous compartiment du réticulum endoplasmique (Hu *et al.*, 2012 ; Nito *et al.*, 2007). Le réticulum endoplasmique recrute des protéines de prolifération peroxysomales aussi appelées peroxines (PEXs). Celles-ci permettent la formation d'une vésicule en recrutant les protéines de membrane peroxysomales (PMPs). Ainsi une vésicule, se détachant du réticulum endoplasmique, devient un peroxysome. En outre, le peroxysome possède la particularité de se reproduire par scissiparité. Le peroxule, excroissance du peroxysome, permet l'interaction avec les autres organelles et intervient également dans la division du peroxysome. En effet, après une étape d'élongation du peroxysome, plusieurs protéines, comme les protéines de fission, interviennent dans la division du peroxysome. Le peroxysome est dépourvu d'acides nucléiques et de machinerie de traduction (ribosomes). Les protéines du peroxysome sont codées par le génome nucléaire et sont traduites dans le cytoplasme. Les protéines sont ensuite acheminées au sein du peroxysome grâce à des signaux d'adressage PTS (Peroxysome Transfert Signal). Il existe deux types de signaux PTS : PTS-1 et PTS-2. PTS-1 est un tripeptide (Serine–Lysine–Leucine) localisé à l'extrémité C-terminale et présent dans la majorité des protéines destinées au peroxysome. PTS-2 est un nonapeptide situé à l'extrémité N-terminale des protéines destinées au peroxysome. Selon le type de PTS, les protéines sont acheminées au peroxysome par l'intermédiaire des récepteurs PEX5 (PTS1) ou PEX7 (PTS2).

Le peroxysome est un organite impliqué dans de nombreuses fonctions métaboliques essentielles telles que la β -oxydation des acides gras, la détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ROS), de l'azote (RNS) et du soufre (RSS), la synthèse de phytohormones telles que l'auxine, l'acide jasmonique ou encore l'acide salicylique (Hu *et al.*, 2012 ; Nito *et al.*, 2007). Le peroxysome joue également un rôle important dans la photorespiration en association avec les mitochondries et les chloroplastes. En plus de ces processus, les peroxysomes sont également impliqués dans d'autres voies métaboliques telles que le cycle du glyoxylate.

Il est nécessaire de noter que, chez les plantes, il existe plusieurs « types » de peroxyosomes, spécialisés dans certaines fonctions métaboliques (Hu *et al.*, 2012 ; Nito *et al.*, 2007). Divers termes ont été utilisés afin de les définir. Les glyoxyosomes sont des peroxyosomes spécialisés présents dans des tissus de stockage des graines oléagineuses tels que l'endosperme et les cotylédons. Les glyoxyosomes renferment des enzymes impliquées dans la β -oxydation des acides gras et du cycle du glyoxylate. Les peroxyosomes foliaires sont des peroxyosomes présents au niveau des tissus photosynthétiques. Ils sont le siège d'une série de réactions impliquées dans la photorespiration. Nous retrouvons également des peroxyosomes dits non spécialisés. Toutefois, à l'heure actuelle, ceux-ci sont regroupés sous le nom général de peroxyosomes.

Les fonctions métaboliques des peroxyosomes

1.4.1. La biosynthèse d'hormones

L'auxine

Généralités

L'auxine est une phytohormone indispensable au développement des plantes. Les études menées par Went, Kogl et Haagen-Smit ont permis la découverte de l'auxine naturelle, l'Acide Indole Acétique (AIA), et de sa structure au début du 20^{ème} siècle (Benjamins *et al.*, 2008). Suite à cette découverte, de nombreuses études ont été menées afin de déterminer son mode d'action dans le développement végétal.

Les rôles de l'auxine sont nombreux. L'auxine agit sur l'élongation et les divisions cellulaires (Benjamins *et al.*, 2008 ; Damodaran *et al.*, 2019). Elle est indispensable pour tous les processus de morphogénèse comme le développement des racines, des parties aériennes, la dominance apicale mais également pour la floraison et la formation de fruits ou encore la réponse à l'environnement (lumière, blessures).

L'action de l'auxine est dépendante de sa concentration dans la cellule, de sa perception, et de la régulation de gènes cibles (Benjamins *et al.*, 2008 ; Damodaran *et al.*, 2019). La concentration est elle-même régulée par la biosynthèse, le transport et la compartimentation de différentes formes de stockage. L'action de l'auxine sur un tissu dépend de sa concentration

mais également de l'environnement cellulaire, que ce soit le modèle étudié (espèce, organe), le tissu ou son stade de développement.

Il est toutefois important de noter qu'il serait plus convenable de parler des auxines (Damodaran *et al.*, 2019). L'AIA est la plus fréquente à l'état naturel mais d'autres formes d'auxines dont l'acide phénylacétique (APA) ou encore l'acide indole butyrique (IBA) ont également été détectées dans les plantes. Ces composés possèdent comme points communs la présence d'un noyau aromatique et une fonction carboxylique.

Synthèse et homéostasie de l'auxine

Deux voies distinctes de biosynthèse impliquées dans la synthèse d'auxine ont été mises en évidence : une voie majoritaire dépendante du tryptophane et une voie indépendante du tryptophane utilisant l'indole 3-glycérolphosphate (IGP) comme précurseur (Benjamins *et al.*, 2008 ; Damodaran *et al.*, 2019 ; Mano *et al.*, 2012).

La synthèse d'AIA se produit essentiellement dans les tissus jeunes, mais aussi dans les cotylédons et les racines. Plus précisément, au niveau racinaire, l'auxine est synthétisée dans les régions méristématiques de la racine principale et des racines secondaires.

Chez les plantes supérieures, la majorité de l'auxine est présente sous forme conjuguée. En effet, chez *A. thaliana*, l'auxine se présente souvent en association avec des sucres, des acides aminés ou des protéines, via des liaisons de type amide.

Sous forme conjuguée, l'auxine est inactive. Ainsi, l'auxine conjuguée peut constituer des formes de stockage, de transport, de protection contre les dégradations ou de détoxification de l'excès d'auxine.

L'acide indole-butyrique (IBA)

Le niveau d'auxine peut être régulé par la conversion de l'AIA à partir de ses formes conjuguées et ses précurseurs.

L'IBA est un précurseur de l'auxine qui est converti en AIA dans un processus de β -oxydation dans les peroxysomes (Frick *et al.*, 2018 ; Korasick *et al.*, 2013 ; Poupart *et al.*, 2000). Chez *Arabidopsis*, une conversion altérée de l'IBA en AIA entraîne de multiples défauts de la plante, indiquant que l'IBA contribue à l'homéostasie de l'auxine de manière critique.

L'IBA possède une structure similaire à l'AIA, à l'exception de sa chaîne latérale : l'AIA possède une chaîne latérale à deux carbones tandis que l'IBA possède une chaîne latérale à quatre carbones (Frick *et al.*, 2018) (Figure 3).

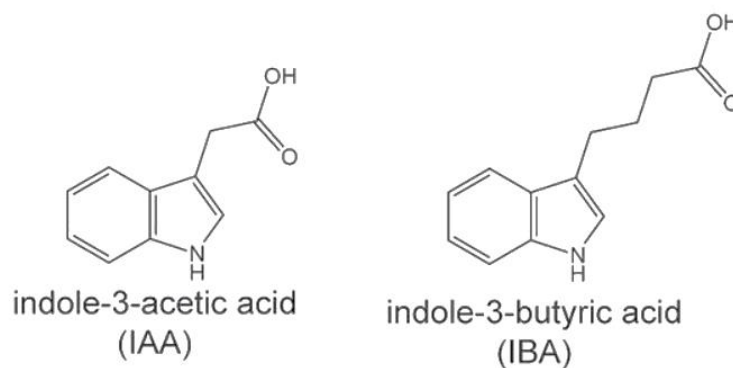


Figure 3 : *Les formules chimiques d'AIA et d'IBA.*

(Frick et al., 2018)

L'AIA est formé d'un noyau indole et d'une courte chaîne latérale à deux carbones portant le groupement carboxyle. L'IBA est formé d'un noyau indole et d'une chaîne latérale à quatre carbones portant le groupement carboxyle.

En raison de sa longue chaîne latérale, l'IBA est dans l'incapacité de se lier au récepteur TIR1 / AFB-Aux / IAA (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 / AUXIN SIGNALING F-BOX PROTEIN-Auxin / INDOLE-3-ACETIC ACID) afin d'initier l'expression des gènes de réponse à l'auxine (Frick *et al.*, 2018 ; Korasick *et al.*, 2013). Par conséquent, les effets physiologiques de l'IBA sont causés par l'AIA dérivée de l'IBA et non par la molécule d'IBA elle-même.

L'IBA est converti en AIA dans un mécanisme parallèle à la β -oxydation des acides gras, permettant la libération de deux carbones au cours de chaque cycle (Frick *et al.*, 2018). Chez les plantes, la β -oxydation des acides gras se produit principalement, sinon exclusivement, dans les peroxysomes.

Différentes enzymes spécifiques sont impliquées dans le processus de conversion de l'IBA en AIA dont INDOLE-3-BUTYRIC ACID RESPONSE1 (IBR1), IBR3, IBR10 et l'énoyl-CoA hydratase 2 (ECH2). D'autres enzymes peuvent également intervenir dans le processus de conversion telles que la 3-cétoacyl CoA thiolase (PED1) et les enzymes acyl-coenzyme A oxydase (ACX).

Les mutants défectueux dans les enzymes de conversion de l'IBA en AIA présentent de multiples défauts dans leur développement comme par exemple des méristèmes racinaires plus petits, ainsi qu'une diminution des niveaux d'AIA (Damodaran *et al.*, 2019 ; Frick *et al.*, 2018). Le traitement par l'IBA ne stimule pas l'organogenèse des racines latérales chez ces mutants, ce qui suggère que l'IBA ne peut pas fonctionner directement pour stimuler la production de racines latérales mais agit plutôt par le biais de sa conversion en AIA.

La conversion d'IBA en AIA crée une source locale d'AIA au niveau de la racine primaire permettant de créer des sites de pré-ramification qui donneront les racines latérales (Xuan *et al.*, 2015). Toutefois, la structuration des racines ne peut être modifiée par l'application exogène d'AIA, déterminant le rôle important de l'IBA dans la ramification de la racine. De plus, l'IBA aurait pour rôle de réguler des acteurs intervenant dans la structuration des racines tels que MEMBRANE-ASSOCIATED KINASE REGULATOR 4 (MAKR4) qui transforme les sites de pré-ramification en racines latérales le long de la racine primaire. Ainsi, la conversion de la conversion d'IBA en AIA jouerait un rôle dans la structuration spatio-temporelle des racines.

1.4.2. La β -oxydation des lipides

Les acides gras sont des acides carboxyliques à chaînes aliphatiques de longueur variable. Ceux-ci sont classés en quatre groupes en fonction de la longueur de leur chaîne aliphatique : les acides gras de courte chaîne C2 à C6, les acides gras à chaîne moyenne C6 à C12, les acides gras à longue chaîne C12 à C18 et les acides gras à très longue chaîne soit au-delà de C18. La synthèse des acides gras a lieu principalement dans les plastes avec pour précurseur l'acétyl-CoA.

La β -oxydation est une voie métabolique essentielle intervenant dans le processus de dégradation des acides gras (Kindl, 1993 ; Poirir *et al.*, 2006). Décrite pour la première fois par Franz Knoop en 1904, cette voie permet la dégradation des acides gras et de molécules dérivées

d'acides gras par l'oxydation du β -carbone et l'élimination subséquente de deux atomes de carbone.

Au sein des plantes, le catabolisme des acides gras via la β -oxydation peroxysomale prédomine (Kao *et al.*, 2018 ; Kindl, 1993 ; Poirir *et al.*, 2006 ; Su *et al.*, 2019). La β -oxydation est un processus essentiel dans la mobilisation des réserves au sein des graines, au cours de leur germination. Les réserves, principalement sous forme de triglycérides, sont mobilisées lors de la croissance germinative avant le développement de la compétence photosynthétique des plantules.

La β -oxydation peroxysomale intervient non seulement dans la conversion des réserves de triglycérides au sein des graines oléagineuses, mais également dans d'autres processus tels que le renouvellement des lipides membranaires, la sénescence, la régulation du métabolisme lipidique des plantes, et la synthèse d'hormones dérivées d'acides gras telles que l'acide jasmonique (Kao *et al.*, 2018 ; Theodoulou *et al.*, 2006).

Les acides gras sont libérés suite à la lipolyse des triglycérides (Kao *et al.*, 2018 ; Rinaldi *et al.*, 2016 ; Rylott *et al.*, 2006 ; Theodoulou *et al.*, 2006). Les triglycérides sont dégradés suite à l'action d'une lipase menant à la libération d'acides gras. Ces acides gras sont activés par thioestérification via les acyl-CoA synthetases (ACS), soit suite à la formation d'une liaison thioester entre le groupement carboxyle de l'acide gras et le groupe thiol du coenzyme A (CoA) formant ainsi des acyl-CoA qui sont importés dans le peroxysome (Figure 4). Les acyl-CoA oxydases (ACX) convertissent l'acyl-CoA en 2-trans-énoyle-CoA en réduisant l'oxygène moléculaire en présence du co-facteur flavine adénine dinucléotide (FAD). Le H_2O_2 généré par le processus peut être éliminé par les catalases (CAT) présentes dans la matrice peroxisomale. Les protéines multifonctionnelles (MFP) oxydent la 2-trans-énoyl-CoA via deux réactions enzymatiques ultérieures formant la 3-cétoacyl-CoA, le substrat pour l'élimination thiolytique d'une unité acétyl-CoA catalysée par des thiolases (KAT).

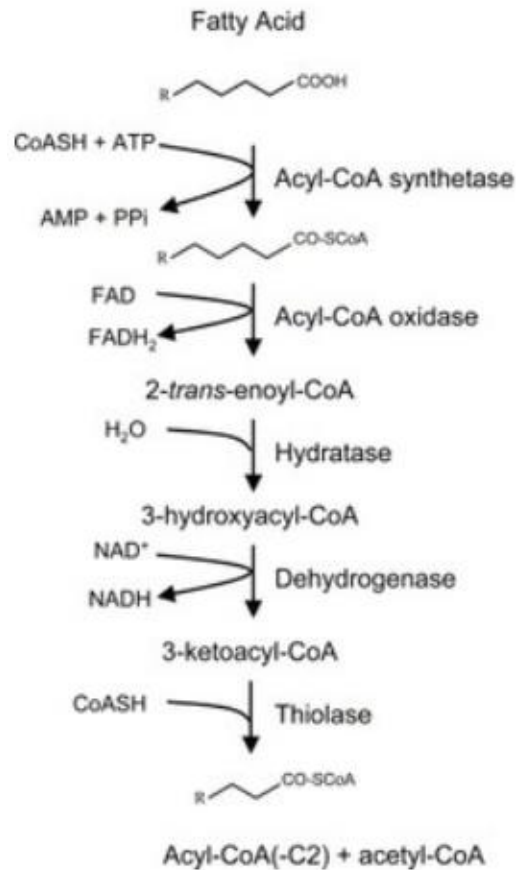


Figure 4 : Les étapes de la β -oxydation des acides gras
(Theodoulou *et al.*, 2006)

Les acétyl-CoA formés alimentent le cycle du glyoxylate qui produit du succinate (Theodoulou *et al.*, 2006). Ce composé est ensuite transporté dans la mitochondrie pour alimenter le cycle TCA et le malate produit, constitue un substrat potentiel de la néoglucogénèse localisée au niveau du cytosol.

En somme, la β -oxydation des acides gras est un processus essentiel ayant lieu dans le peroxyosome et jouant un rôle important à différents stades de la vie de la plante (de la germination à la plante mature).

1.4.3. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif, aussi appelé stress oxydant, est un phénomène chimique et physiologique complexe qui est la conséquence de pratiquement tous les stress biotiques et abiotiques subis par les plantes (Huang *et al.*, 2019 ; Kao *et al.*, 2018). Ce phénomène se développe à la suite de

la surproduction et de l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). En effet, le stress oxydatif, défini par Sies en 1997, est la conséquence d'un déséquilibre entre la production de ROS et l'élimination de ceux-ci au moyen de systèmes de défense antioxydants, avec pour conséquence l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule.

Dans le cas d'un stress oxydatif, divers ROS peuvent être présents parmi lesquels nous retrouvons les anions superoxydes, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle (Kao *et al.*, 2018). Les plantes possèdent la capacité de mettre en œuvre diverses stratégies de tolérance aux stress, notamment par l'intermédiaire d'antioxydants (Huang *et al.*, 2019 ; Kao *et al.*, 2018). Ceux-ci sont des molécules possédant la capacité d'inhiber directement la production de ROS, ou de limiter leur propagation, en formant par exemple un composé stable, ou encore de détruire les ROS. La ligne de défense mise en place par la plante est principalement constituée de trois enzymes : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et les peroxydases (POX). Toutefois, d'autres molécules antioxydantes peuvent également intervenir.

1.4.4. La photorespiration

La photorespiration découle de la fonction oxygénase de l'enzyme RuBisCO qui permet la production d'une molécule de phosphoglycérate (3-PGA) et d'une molécule de 2-phosphoglycolate (2-PG) à partir d'une molécule d'oxygène (O₂) et une molécule de ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) (Bauwe *et al.*, 2010; Foyer *et al.*, 2009). Le 2-PG étant une molécule très toxique, la photorespiration permet la conversion de cette molécule en 3-PGA qui pourra être métabolisée par des voies métaboliques dont le cycle de Calvin-Benson.

La photorespiration se déroule au sein de divers compartiments subcellulaires soit au sein du chloroplaste, du peroxysome, de la mitochondrie et dans le cytosol (Bauwe *et al.*, 2010; Foyer *et al.*, 2009; Foyer, 2018) (Figure 5).

Dans un premier temps, dans le chloroplaste, le 2-PG produit par la RuBisCO est immédiatement déphosphorylé afin de donner une molécule de glycolate. Le glycolate est ensuite transporté au sein du peroxysome. Dans ce compartiment, le glycolate est converti en glyoxylate puis en glycine. Cette étape requiert la présence d'oxygène et produit une molécule de peroxyde d'hydrogène qui est dégradée dans le peroxysome, au moyen d'enzyme dont la catalase. La glycine est ensuite transportée dans la mitochondrie où elle est convertie en sérine,

avec la production de CO_2 , d'ammoniac (NH_4^+) et de NADH. La sérine est importée dans le peroxyosome afin d'être successivement transformée en hydroxypyruvate puis en glycérate avec consommation de NADH. En dernier lieu, le glycérate est transporté dans le chloroplaste où il est phosphorylé en 3-PGA avec consommation d'ATP. Ce dernier peut ainsi entrer de nouveau dans le cycle de Calvin-Benson.

La photorespiration est donc un cycle qui, à partir de 2 molécules de 2-PG, permet la production d'une molécule de 3-PGA, deux molécules de peroxyde d'hydrogène. Pour ce faire, lors du cycle, nous observons la perte d'une molécule de CO_2 et d'ammoniac et la consommation d'un ATP. Par d'ailleurs, le terme « photorespiration » provient du fait de la prise d'oxygène et la libération de CO_2 lors du cycle.

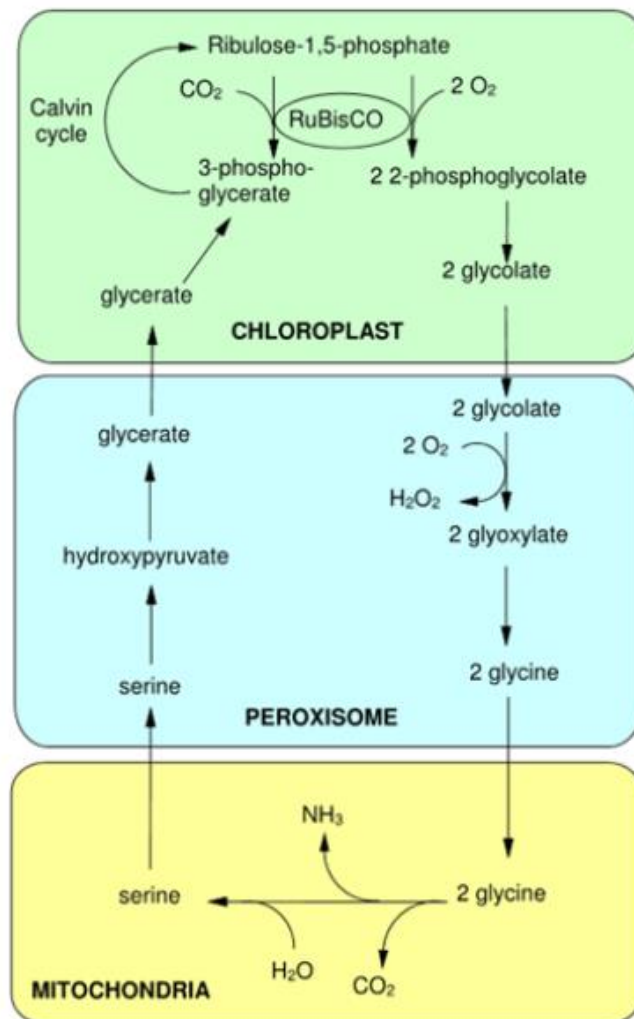


Figure 5 : Les étapes de la photorespiration ont lieu dans trois compartiments subcellulaires : le chloroplaste, le peroxyosome, et la mitochondrie.

(http://ressources.unisciel.fr/photosynthese/co/grain_44.html)

1.4.5. L'accumulation de peroxyde d'hydrogène

Le peroxydosome possède un grand nombre de systèmes enzymatiques capable de générer du H₂O₂ tels que par exemple, la glycolate oxydase intervenant dans la photorespiration et responsable de plus de 70% du H₂O₂ généré dans le peroxydosome ou encore l'acyl-CoA oxydase intervenant dans la β-oxydation des lipides (Corpas *et al.*, 2017 ; Hauck *et al.*, 2014). Le peroxyde d'hydrogène joue lui-même un rôle important de molécule signal entre les différents compartiments subcellulaires (Corpas *et al.*, 2020).

Toutefois, un contrôle accru du niveau de H₂O₂ présent dans le peroxydosome est primordial afin d'éviter une accumulation importante conduisant à des effets néfastes pour l'organisme (Corpas *et al.*, 2020).

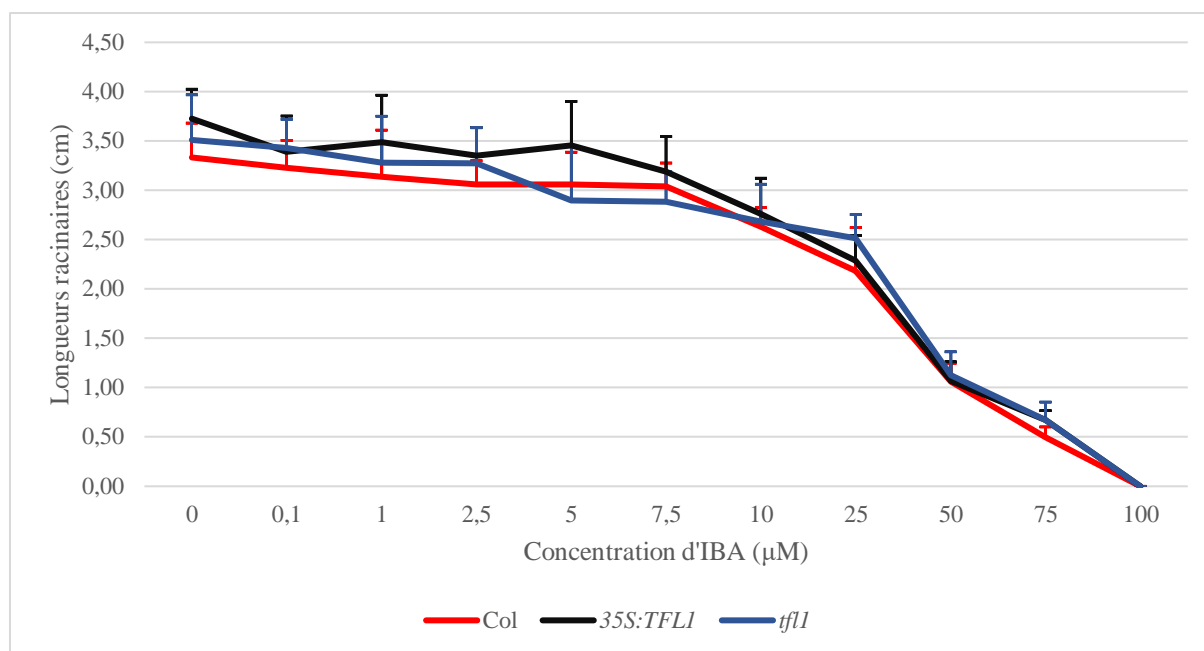
2. CHAPITRE II: Expériences préliminaires

2.1. Métabolisme de l'auxine

Un de nos principaux objectifs a été d'évaluer la sensibilité du mutant *tfl1* et du surexpresser *35S:TFL1* au précurseur d'auxine IBA. L'idée sous-jacente est que si TFL1 interagit avec les enzymes de la conversion de l'IBA en auxine active AIA, la réponse biologique à l'IBA sera affectée par la perte de fonction ou la surexpression du gène. L'AIA réprime la croissance de la racine primaire des plantules ; ce phénotype est souvent utilisé pour réaliser des tests de sensibilité.

Les plantules des mutants *tfl1* et *35S:TFL1* ont été cultivées *in vitro*, sur milieu 0,5xMS contenant 1% de saccharose et différentes concentrations d'IBA, en jours longs de 16h, à 20°C. Pour chaque phénotype et chaque concentration d'IBA, un total de 30 plantules ont été semées. Les plantules ont été scannées afin de mesurer leurs racines au moyen des programmes ImageJ et SmartRoot.

Les données sont obtenues 10 jours après le semis et ont été représentées sous forme de graphique. Trois expériences indépendantes ont été réalisées. Les résultats ci-dessous sont représentatifs d'une expérience et ont été confirmés par les deux autres expériences indépendantes (Annexe 1).



Graphique 1 : Effet de l'IBA sur la croissance de la racine primaire de plantules d'*A. thaliana* ; comparaison des génotypes de type sauvage (Col), du mutant *tfl1* et des surexprimeurs *35S:TFL1*. Les mesures ont été réalisées sur des plantules de 10 jours, semées directement sur milieu 0,5x MS, 1% saccharose, contenant différentes concentrations en IBA.

La graphique 1 montre que l'IBA inhibe la croissance racinaire de tous les génotypes à partir d'une concentration de 10 μM. L'inhibition est totale à une concentration de 100 μM d'IBA: les racines ne sont pas mesurables.

La croissance racinaire des différents génotypes est similaire pour une concentration en IBA allant de 0 à 5 μM. Nous observons une longueur racinaire de 3,5 cm en moyenne pour ces concentrations. A la suite de ce plateau, nous observons une diminution de la longueur des racines avec l'augmentation de la concentration d'IBA présente dans le milieu. Toutefois, nous pouvons constater que le mutant *tfl1* semblerait moins affecté par l'action de l'IBA entre les concentrations allant de 7,5 à 25 μM d'IBA. En effet, on observe une diminution moins forte de la croissance racinaire.

Toutefois, en prenant compte tous les résultats, soit les trois répétitions indépendantes (Annexe 1), nous ne pouvons affirmer qu'il existe une réelle différence entre les différents phénotypes.

2.2. Analyse du transcriptome du mutant *tfl1*

L'analyse du transcriptome du mutant *tfl1* par RNA-seq a été réalisée au préalable au sein du laboratoire. Les plantules échantillonnées étaient cultivées en culture *in vitro*, sur milieu 0,5xMS, 1% saccharose, en jours longs de 16h, à 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ d'intensité lumineuse et 20°C. Les parties aériennes et racinaires du mutant et du contrôle (WT) ont été récoltées après 5 jours de croissance. L'expérience a été répétée trois fois pour obtenir des répliques biologiques. Le séquençage d'ARNm a été réalisé par la plateforme GIGA-Genomics par la méthode Illumina.

Dans un premier temps, les séquences obtenues ont été « mappées » sur le transcriptome d'*A.thaliana* au moyen du programme HTSeq. La vérification des données brutes et la normalisation des données afin de pouvoir les comparer ont été réalisées en utilisant le package R Deseq2. Dans un second temps, les répliques biologiques ont été utilisés afin d'identifier les gènes différentiellement exprimés (WT vs *tfl1*). Diverses informations sont obtenues : le Fold change (nombre de fois que le gène est surexprimé ou sous-exprimé chez le mutant par rapport au WT), le basemean (expression de base moyenne), l'erreur-standard et la p-value ajustée (p-value corrigée dans le cas de test multiple). Deux critères ont été utilisés pour filtrer la liste des gènes différentiellement exprimés (DEG) : une valeur absolue de Fold-change supérieure à 2 et une p-value ajustée inférieure à 0,05. La liste complète des DEG peut être sollicitée auprès du Professeur C. Périlleux (cperilleux@uliege.be) car elle n'est pas encore publiée.

Il était initialement prévu de vérifier les résultats obtenus par le RNA-seq, en réalisant une RT-qPCR sur un certain nombre de gènes. Vu l'inaccessibilité du laboratoire pendant la pandémie Covid-19, le travail a été limité à une analyse théorique des résultats. La représentation graphique des résultats a été réalisée par Frédéric Bouché.

Dans les racines, les transcrits de 20 761 gènes ont été détectés. Parmi ces gènes, 486 DEG chez le mutant *tfl1* par rapport au WT. Ces DEG sont soit surexprimés (UP) chez le mutant *tfl1*, soit sous-exprimés (DOWN), par rapport au WT. Ils se répartissent plus ou moins à part égale puisque chez le mutant *tfl1*, nous retrouvons 224 gènes DOWN et 262 gènes UP (Figure 6).

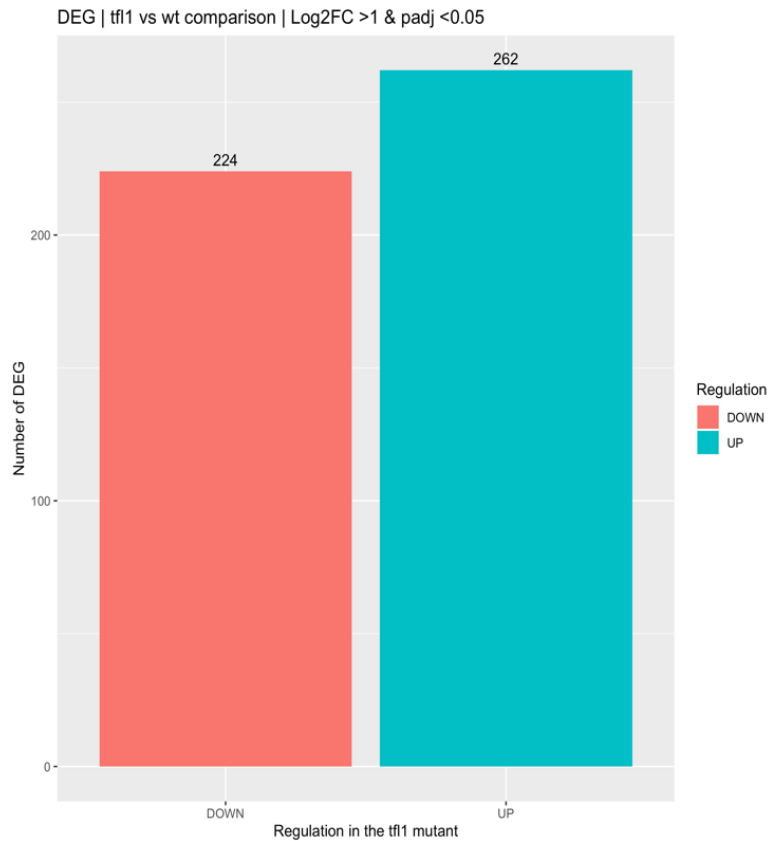


Figure 6 : *Nombre de gènes différentiellement exprimés dans les racines du mutant *tf1* par rapport au WT. DOWN : gènes sous-exprimés ; UP : gènes sur-exprimés*

Au niveau des parties aériennes du mutant *tf1*, les transcrits de 19 458 gènes ont été détectés parmi lesquels 699 DEG par rapport au WT. Contrairement à ce qu'on peut observer dans les racines, on constate une différence importante de la proportion de gènes sous-exprimés par rapport aux gènes surexprimés. En effet, sur 699 DEG, 633 sont DOWN et seulement 66 sont UP chez le mutant (Figure 7).

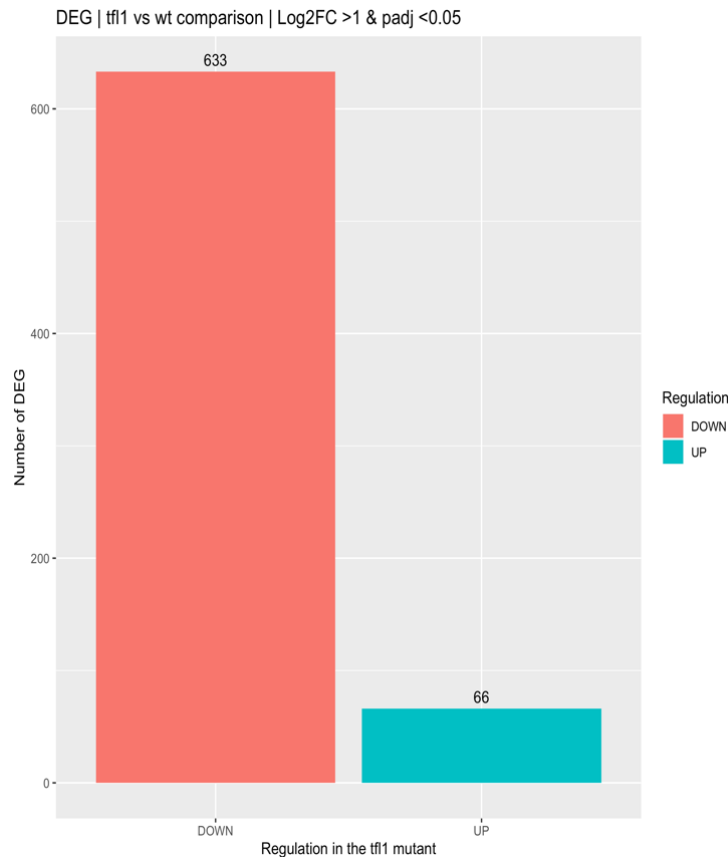


Figure 7 : *Nombre de gènes différentiellement exprimés dans les parties aériennes du mutant tfl1 par rapport au WT. DOWN : gènes sous-exprimés ; UP : gènes sur-exprimés*

Afin de savoir si ce sont les mêmes gènes qui sont différentiellement exprimés dans les racines et les parties aériennes, les données ont été regroupées/croisées (Figure 8). Un certain nombre de gènes sont régulés de la même manière au niveau des deux parties distinctes de la plante. En effet, on observe 90 DEG qui sont DOWN dans les parties aériennes et racinaires tandis que 16 gènes communs sont UP. Seuls deux DEG sont exprimés différemment dans les parties aériennes et racinaires. En effet, ces deux-ci sont sous-exprimés dans les parties aériennes alors qu'ils sont surexprimés dans les parties racinaires. Il s'agit des gènes *CYP706A1* et *CDEF1*. *CYP706A1* code pour un cytochrome P450 (cytochrome P450, famille 706, sous-famille A, polypeptide 1). Les cytochromes P450 constituent une superfamille d'hémoprotéines qui catalysent des réactions d'oxydoréduction (Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000). *CDEF1*, quant à lui, code pour la protéine CDEF1, membre de la famille des lipases dite « GDSL » et qui fonctionne comme une cutinase (Takahashi *et al.*, 2010)

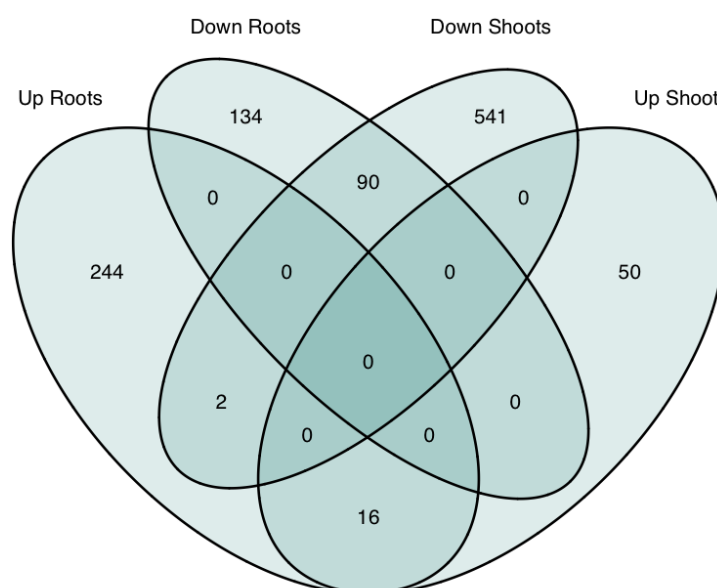


Figure 8 : *Gènes différentiellement exprimés dans les parties aériennes et racinaires du mutant *tfl1*. UP Roots : gènes surexprimés dans les racines, DOWN Roots : gènes sous-exprimés dans les racines, UP Shoots : gènes surexprimés dans les parties aériennes, UP Roots : gènes surexprimés dans les racines*

Par ailleurs, dans la liste des DEG au sein des racines et des parties aériennes, nous avons cherché à identifier les gènes intervenant dans les fonctions du peroxyosome. En effet, le peroxyosome possède un grand nombre de fonctions métaboliques telles que la biosynthèse d'hormones dont l'auxine, la β -oxydation des lipides, ou encore la gestion du stress oxydatif.

Le tableau 1 reprend ma sélection de DEG détectés dans les parties racinaires du mutant *tfl1* qui interviennent dans des fonctions métaboliques du peroxyosome. Nous remarquons la présence d'un certain nombre de gènes intervenant dans la signalisation d'hormones telles que l'acide jasmonique et l'auxine. En effet, nous retrouvons par exemple *JAZ8* ou encore *JAZ10* qui interviennent dans la réponse à l'acide jasmonique (The Arabidopsis Information Resource (TAIR)). En ce qui concerne l'auxine, nous retrouvons principalement un transporteur d'auxine, *PIN5* mais également d'autres gènes de la famille des SAUR qui sont des gènes induits par l'auxine (TAIR). Une série de gènes intervenant dans la biosynthèse des acides gras et dans la β -oxydation de ceux-ci sont également différentiellement exprimés. En effet, nous retrouvons par exemple *KAT5* (3-ketoacyl-CoA thiolase 5) qui intervient dans la biosynthèse

des acides gras mais également dans la biosynthèse de l'acide jasmonique (TAIR). Des gènes ayant un rôle dans la réponse au stress oxydatif sont également DEG dans les parties racinaires du mutant. Ainsi, nous retrouvons des gènes surexprimés tels que la *CATALASE3* et l'*ASCORBATE PEROXYDASE 4*, tandis que d'autres peroxydases sont sous-exprimées.

		Locus	Nom du gène	Nom	Log₂FC	p-value	Fonctions
Parties racinaires	DOWN	AT1G3013 5	JAZ8	Jasmonate-zim-domain protein 8	-5,06	9,90E-06	Répresseur de la réponse au jasmonate
		AT1G5147 0	BGLU35	Beta glucosidase 35	-2,75	7,04E-10	Activité bêta glucosidase
		AT1G4760 0	BGLU34	Beta glucosidase 34	-2,41	1,71E-07	Activité bêta glucosidase
		AT5G1322 0	JAZ10	Jasmonate-zim-domain protein 10	-2,18	2,53E-05	Régulation de la voie de signalisation de l'acide jasmonique
		AT1G1738 0	JAZ5	Jasmonate-zim-domain protein 5	-2,09	3,71E-07	Régulation de la voie de signalisation de l'acide jasmonique
		AT1G0609 0		Fatty acid desaturase family protein	-1,94	1,04E-07	Intervient dans la biosynthèse des acides gras
		AT5G1653 0	PIN5	Auxin efflux carrier family protein	-1,92	5,46E-04	Transporteur d'auxine
		AT1G0995 0	RAS1	Response to ABA and salt 1	-1,87	4,72E-05	Régulation de la voie de signalisation de l'acide abscissique, Réponse au stress salin
		AT5G2407 0		Peroxidase superfamily protein	-1,75	6,50E-04	Intervient dans la réponse au stress oxydatif
		AT4G3598 5		Senescence/dehydration-associated protein-like protein	-1,66	1,58E-14	Réponse au froid et stress salin

		AT4G1050 0		2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	-1,25	7,48E-06	Intervient dans la défense contre stress
		AT2G4148 0		Peroxidase superfamily protein	-1,18	1,87E-04	Réponse au stress oxydatif
		AT1G6027 0	BGLU6	Beta glucosidase 6	-1,11	2,43E-03	Métabolisme des carbohydrates
		AT5G4888 0	KAT5	Peroxisomal 3-keto-acyl-coa thiolase 2	-1,10	4,37E-09	Bêta-oxydation des acides gras, biosynthèse de l'acide jasmonique
		AT1G2848 0	GRX480	Thioredoxin superfamily protein	-1,10	9,34E-04	Voie de signalisation de l'acide jasmonique
	UP	AT2G4574 0	PEX11D	Peroxin 11D	1,11	6,59E-05	Organisation du peroxysome
		AT1G2062 0	CAT3	Catalase 3	1,23	2,68E-12	Conversion du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène
		AT4G0901 0	TL29	Ascorbate peroxidase 4	1,42	1,46E-03	Réponse au stress oxydatif
		AT5G0966 0	PMDH2	Peroxisomal NAD-malate dehydrogenase 2	1,47	1,06E-05	Bêta-oxydation des acides gras
		AT4G0878 0		Peroxidase superfamily protein	1,70	1,46E-04	Réponse au stress oxydatif
		AT1G6853 0	KCS6	3-ketoacyl-coa synthase 6	1,89	8,90E-07	Biosynthèse des acides gras
		AT3G1442 0	GOX1	Aldolase-type TIM barrel family protein	1,89	4,22E-10	Glycolate oxidase: processus d'oxydo-réduction, processus de biosynthèse du H2O2
		AT3G6275 0	BGLU8	Beta glucosidase 8	2,38	8,15E-04	Activité bêta-glucosidique
		AT2G2863 0	KCS12	3-ketoacyl-coa synthase 12	2,46	3,08E-05	Biosynthèse des acides gras

		AT4G3884 0		SAUR-like auxin- responsive protein family	3,77	5,45E-05	Intervient dans la voie de signalisation de l'auxine
		AT4G3477 0		SAUR-like auxin- responsive protein family	4,07	6,50E-04	Intervient dans la voie de signalisation de l'auxine
		AT4G3882 5		SAUR-like auxin- responsive protein family	4,41	2,10E-03	Intervient dans la voie de signalisation de l'auxine
		AT5G1808 0	SAUR24	SAUR-like auxin- responsive protein family	4,52	1,32E-03	Intervient dans la voie de signalisation de l'auxine
		AT1G2945 0		SAUR-like auxin- responsive protein family	4,57	9,39E-04	Intervient dans la voie de signalisation de l'auxine
		AT3G0384 0	SAUR27	SAUR-like auxin- responsive protein family	5,07	4,92E-04	Intervient dans la voie de signalisation de l'auxine
		AT1G0635 0	ADS4	Fatty acid desaturase family protein	5,26	2,45E-04	Activité oxydoréductase, intervient dans la biosynthèse des acides gras insaturés

Tableau 1: *Liste des DEG détectés dans les racines du mutant *tfl1* et intervenant dans des fonctions métaboliques du peroxysome.*

Ma sélection de DEG détectés dans les parties aériennes du mutant *tfl1* et ayant un lien éventuel avec les fonctions des peroxysomes est reprise dans le tableau 2.

		Locus	Nom du gène	Nom	Log₂FC	p-value	Fonctions
Parties aériennes	DOWN	AT1G30135	JAZ8	Jasmonate-zim-domain protein 8	-6,97	8,84E-08	Régulation de la voie de signalisation de l'acide jasmonique
		AT1G17380	JAZ5	Jasmonate-zim-domain protein 5	-5,13	1,96E-13	Régulation de la voie de signalisation de l'acide jasmonique
		AT3G09940	MDHAR	Monodehydroascorbate reductase	-5,13	1,44E-11	Biosynthèse des acides gras
		AT3G09870		SAUR-like auxin-responsive protein family	-4,53	1,26E-04	Intervient dans la voie de signalisation de l'auxine
		AT5G13220	JAZ10	Jasmonate-zim-domain protein 10	-3,31	1,85E-09	Régulation de la voie de signalisation de l'acide jasmonique
		AT1G19180	JAZ1	Jasmonate-zim-domain protein 1	-3,24	9,35E-12	Régulation de la voie de signalisation de l'acide jasmonique
		AT1G17420	LOX3	Lipoxygenase 3	-3,12	8,47E-08	Biosynthèse de l'acide jasmonique
		AT5G35735		Auxin-responsive family protein	-2,37	1,26E-18	Intervient dans la voie de signalisation de l'auxine
		AT1G14540	PER4	Peroxidase superfamily protein	-2,27	1,28E-04	Réponse au stress oxydatif
		AT5G39580		Peroxidase superfamily protein	-1,84	7,05E-10	Réponse au stress oxydatif
		AT3G12830		SAUR-like auxin-	-1,80	1,37E-11	Intervient dans la voie de

			responsive protein family			signalisation de l'auxine	
		AT1G60270	BGLU6	Beta glucosidase 6	-1,72	5,55E-05	Métabolisme des carbohydrates
		AT1G26560	BGLU40	Beta glucosidase 40	-1,66	2,22E-07	Métabolisme des carbohydrates
		AT2G36690		2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent Oxygenase superfamily protein	-1,43	1,29E-04	Intervient dans la défense contre les stress
		AT1G72450	JAZ6	Jasmonate-zim-domain protein 6	-1,16	2,60E-07	Régulation de la voie de signalisation de l'acide jasmonique
	UP	AT5G56550	OXS3	Oxidative stress 3	1,30	2,45E-05	Intervient dans la réponse au stress oxydatif et dans la régulation de l'induction de la floraison
		AT3G30720	QQS	Qua-quine starch	3,38	8,18E-23	Régule l'allocation de l'azote et du carbone à l'amidon et aux protéines

Tableau 2 : Liste des DEG exprimés dans les parties aériennes du mutant *tfl1* et intervenant dans des fonctions métaboliques du peroxysome.

Certains gènes sous-exprimés dans les parties racinaires du mutant *tfl1* le sont également dans les parties aériennes. En effet, les gènes intervenant dans la voie de signalisation de l'acide jasmonique soit *JAZ5*, *JAZ8* et *JAZ10* sont sous-exprimés dans les racines et dans les parties aériennes.

Des DEG intervenant dans la gestion du stress oxydatif sont également détectés. Nous retrouvons notamment *OXS3*, décrit comme étant un gène impliqué dans la tolérance à différents métaux lourds tels que le cadmium et au stress oxydatif (Blanvillain *et al.*, 2009). En effet, la surexpression de *OXS3* améliore la tolérance au cadmium chez *Arabidopsis*, alors que

le mutant *oxs3* est légèrement plus sensible (Liang *et al.*, 2019). Il est intéressant de noter que *OXS3* joue également un rôle dans la régulation de la floraison : l'absence d'*OXS3* provoque une floraison précoce chez *A.thaliana* qui a été soumis à un stress (sécheresse), mimant une situation d'évitement (Liang *et al.*, 2019). La protéine *OXS3* peut se lier physiquement à *SOC1* et réprimer *API* atténuant ainsi la transition florale. Etant donné que son absence conduit à une floraison précoce en condition de stress, il a été suggéré qu'*OXS3* agirait comme un répresseur afin de s'assurer qu'une situation de stress ne conduit pas directement à une floraison précoce.

La présence de ces DEG suggère que la mutation *tfl1* altère les fonctions métaboliques du peroxyosome, de même que les voies de signalisation de l'acide jasmonique et de l'auxine. Toutefois, afin de s'assurer de la validité des résultats, il serait primordial de vérifier leur expression différentielle en réalisant notamment une RT-qPCR.

Le stress oxydatif

Les mécanismes moléculaires de réponse au stress oxydatif sont particulièrement bien connus chez *Arabidopsis*. Selon les expériences rapportées dans la littérature, le stress oxydatif peut être occasionné par différents types de traitements : environnementaux (exposition à de fortes intensités lumineuses, réduction de la disponibilité en CO₂) ou chimique (exposition à des inhibiteurs du transport photosynthétique des électrons). Une autre approche est la comparaison de mutants déficients dans l'une ou l'autre voie d'élimination des ROS. Le Prof. Frank Van Breusegem et son équipe ont réalisé une méta-analyse des résultats de 79 expériences indépendantes afin de dégager les réseaux de régulation majeurs (Willems *et al.*, 2016). Dans les expériences utilisées, des traitements chimiques, des modifications génétiques, des stress environnementaux ou même une combinaison de ceux-ci ont permis de provoquer la perturbation des ROS. Toutes les données brutes des 79 microarrays ont été récoltées et traitées simultanément permettant d'établir le profil d'expression différentielle des gènes d'*A.thaliana*. Le nombre de DEG varie entre 2 à 6 430 gènes par profil. Les différentes études ont révélé un total de 157 profils d'expression repris dans 12 catégories de perturbations, regroupant chacune 4 à 34 profils d'expression.

Les chercheurs ont établi la « ROS wheel » en ayant recours au coefficient de Sørensen-Dice (DSC (a, b) = $2 \text{ nab} / (\text{na} + \text{nb})$). Celui-ci permet de calculer le degré de similitude entre les profils d'expression en se basant sur la présence-absence de gènes (Sottani *et al.*, 2019). La

dissimilarité, soit 1-DSC, a été utilisée comme mesure de distance afin d'établir la classification hiérarchique. Par conséquent, les transcriptomes partageant un grand nombre de DEG résident à proximité l'un de l'autre résultant à la formation de la « ROS Wheel ». Huit clusters, contenant au minimum cinq profils d'expression provenant d'au moins deux études indépendantes, ont été mis en évidence.

Le cluster I, aussi appelé le cluster « GUN retrograde », regroupe les données obtenues suite à des traitements affectant la biogenèse du chloroplaste et des profils d'expression du mutant *genomes uncoupled 1 (gun1)* affecté dans la signalisation rétrograde des plastes.

Le cluster II ou cluster « HL late » regroupe les profils d'expression obtenus suite à une exposition de longue durée (3 à 8 heures) à une intensité lumineuse importante. Le cluster III ou cluster « HL early » contient les profils d'expression obtenus suite à une exposition de courte durée (30 minutes à 2 heures) à une intensité lumineuse importante. Par conséquent, les clusters II et III ne diffèrent que sur le temps d'exposition à une intensité lumineuse élevée.

Le cluster IV, aussi appelé cluster « ROS-CC », regroupe les profils d'expression obtenus en culture cellulaire suite une accumulation de ROS engendrée soit par une inhibition de la chaîne de transfert d'électron mitochondriale et de l'ATP synthase soit par traitement avec du peroxyde d'hydrogène.

Le cluster V, soit le cluster « ROS », comprend les données obtenues suite à l'induction directe ou indirecte de ROS. Il s'agit du cluster le plus important puisque celui-ci regroupe au total 20 profils d'expression de gènes.

Le cluster VI, soit le cluster « O₂-UV-B » early, regroupe les profils d'expression obtenus suite à des traitements par radiations UV-B. Tandis que le cluster « RBOHF », le cluster VII, regroupe les données obtenues suite à des études menées afin de déterminer l'impact de la NADPH oxydase RBOHF (Respiratory Burst Oxidase Homolog Protein F) lors d'un stress oxydatif.

Le dernier cluster, soit le cluster VIII ou cluster « ROS acclimation » est constitué de profils d'expression de cinq mutants redox.

Les données obtenues par le RNA-seq du mutant *tfl1* réalisé dans le laboratoire ont été croisées avec la méta-analyse réalisée par F. Van Breusegem et son équipe. En ce qui concerne les gènes détectés dans les parties aériennes chez le mutant *tfl1*, nous observons un nombre relativement important de DEG faisant partie des clusters II, III, VII et dans une moindre mesure des gènes appartenant aux clusters V et VIII (Figure 9). Par contre dans les parties racinaires du mutant *tfl1*, nous retrouvons majoritairement des DEG faisant partie du cluster I.

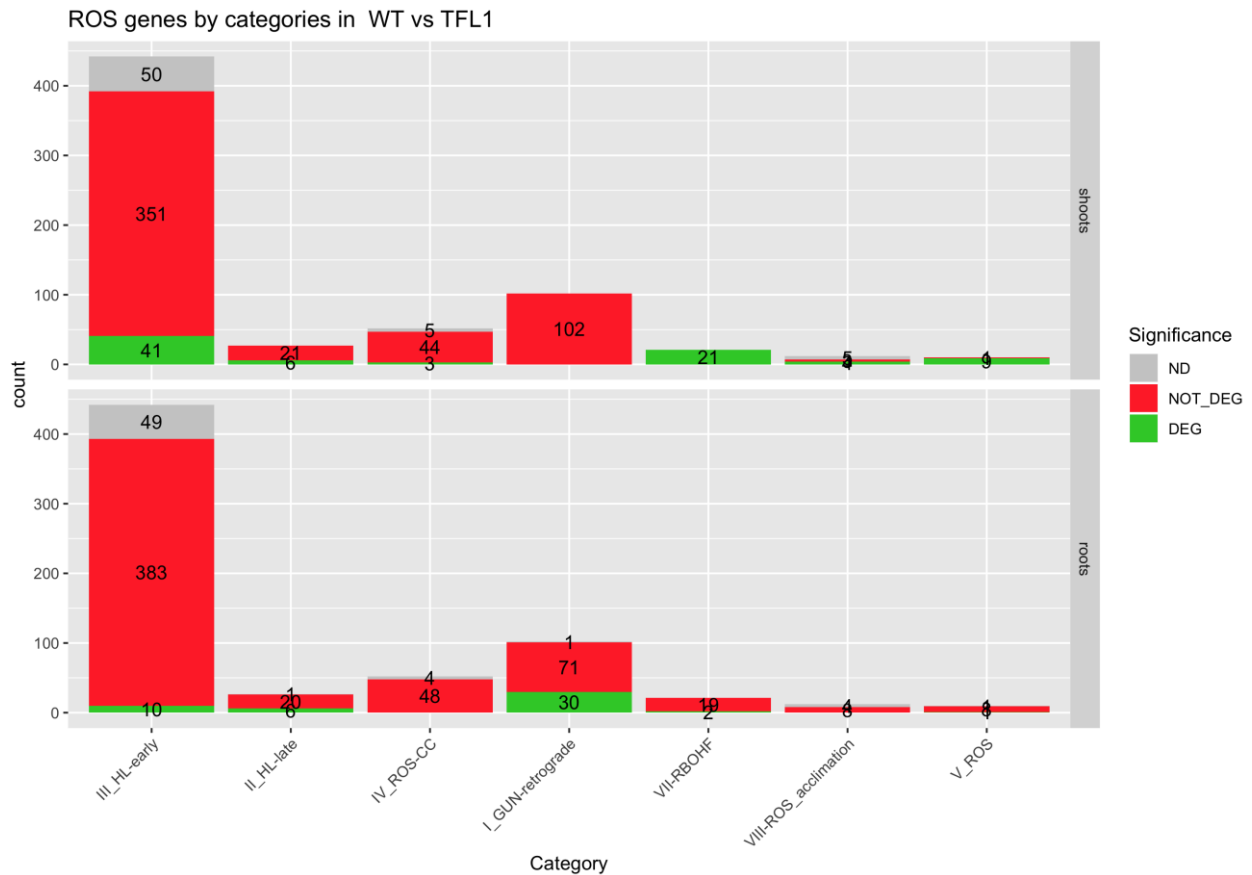


Figure 9 : Classification des gènes exprimés dans le mutant *tfl1*, selon la méta-analyse transcriptomique du stress oxydatif de Willems et al., 2016. La partie supérieure du graphique représente les DEG détectés dans les parties aériennes et la partie inférieure du graphique représente les DEG détectés dans les racines. Rouge : gènes non différenciellement exprimés (NOT DEG); Vert : DEG ; Gris : gènes non détectés (ND). Pour la signification des clusters, voir le texte principal.
Chiffres des Clusters VIII et V : Parties aériennes : Cluster VIII : 5 ND, 3 NOT DEG, 4 DEG ; Cluster V : 1 ND, 0 NOT DEG, 9 DEG. **Racines :** Cluster VIII : 4 ND, 8 NOT DEG, 0 DEG ; Cluster V : 1 ND, 8 NOT DEG, 1 DEG.

Le tableau 3 ci-dessous reprend la liste des DEG dans les parties aériennes et le tableau 4 montre les DEG détectés dans les parties racinaires du mutant *tfl1*.

	Cluster	Locus	Nom	Log ₂ FC	p-value
UP	ClusterII : HL-late	AT1G34760	General regulatory factor 11	1,07	4,47E-05
		AT4G28240	Wound-responsive family protein	1,21	1,38E-07
		AT1G11260	Sugar transporter 1	1,43	8,21E-03
	ClusterIII : HL-early	AT1G66890	PTHR34542:SF1 - 50S RIBOSOMAL PROTEIN RELATED PROTEIN (1 of 2)	1,01	4,51E-03
		AT5G01740	Nuclear transport factor 2 (NTF2) family protein	1,02	1,91E-02
		AT4G28240	Wound-responsive family protein	1,21	1,38E-07
DOWN	ClusterII : HL-late	AT3G22840	Chlorophyll a, b binding family protein	-1,94	9,15E-05
	ClusterIII : HL-early	AT5G62520	Similar to RCD one 5	-4,80	1,18E-07
		AT1G61340	F-box family protein	-4,15	2,29E-10
		AT5G45630	Protein of unknown function, DUF584	-4,04	5,64E-04
		AT5G63130	Octicosapeptide/Phox/Bem1p family protein	-2,94	1,55E-05
		AT5G59820	C2H2-type zinc finger family protein	-2,92	2,32E-19
		AT5G17350	PF14009 - Domain of unknown function (DUF4228) (DUF4228) (1 of 28)	-2,84	1,12E-18
		AT1G62560	Flavin-monooxygenase glucosinolate S-oxygenase 3	-2,76	1,63E-06
		AT1G78070	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	-2,76	7,62E-05
		AT3G04640	Glycine-rich protein	-2,75	3,53E-14
		AT3G62260	Protein phosphatase 2C family protein	-2,61	7,98E-08
		AT5G64310	Arabinogalactan protein 1	-2,59	7,94E-06
		AT5G05410	DRE-binding protein 2A	-2,57	6,46E-06
		AT3G58990	Isopropylmalate isomerase 1	-2,27	2,78E-11
		AT1G18590	Sulfotransferase 17	-2,04	7,38E-06
		AT3G22840	Chlorophyll a, b binding family protein	-1,94	9,15E-05
		AT4G12030	Bile acid transporter 5	-1,90	2,26E-08
		AT4G14690	Chlorophyll a, b binding family protein	-1,85	1,04E-08
		AT3G28210	Zinc finger (AN1-like) family protein	-1,84	2,88E-02
		AT3G23170		-1,84	2,05E-08
AT4G36010	Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein	-1,81	9,40E-04		

	AT5G10695		-1,68	6,52E-05
	AT1G18570	Myb domain protein 51	-1,67	2,46E-06
	AT1G20450	Dehydrin family protein	-1,54	8,87E-11
	AT1G29690	MAC/Perforin domain-containing protein	-1,52	4,54E-07
	AT1G09070	Soybean gene regulated by cold-2	-1,48	2,04E-10
	AT1G67360	Rubber elongation factor protein (REF)	-1,42	1,03E-02
	AT5G16200	50S ribosomal protein-related	-1,31	3,15E-02
	AT1G71880	Sucrose-proton symporter 1	-1,30	2,02E-08
	AT2G46830	Circadian clock associated 1	-1,27	1,72E-06
	AT4G13770	Cytochrome P450, family 83, subfamily A, polypeptide 1	-1,25	2,98E-07
	AT4G36990	Heat shock factor 4	-1,14	2,26E-02
	AT4G11660	Winged-helix DNA-binding transcription factor family protein	-1,02	1,73E-02
	AT1G63090	Phloem protein 2-A11	-1,01	7,86E-04
ClusterIV : ROS-CC	AT4G07960	Cellulose-synthase-like C12	-1,98	6,64E-05
	AT4G33560	Wound-responsive family protein	-1,79	3,87E-02
	AT2G43290	Calcium-binding EF-hand family protein	-1,78	1,53E-12
ClusterV : ROS	AT1G56060	PTHR31568:SF17 - EXPRESSED PROTEIN (1 of 5)	-3,97	7,22E-04
	AT2G38470	WRKY DNA-binding protein 33	-2,36	4,19E-04
	AT4G14365	XB3 ortholog 4 in Arabidopsis thaliana	-2,33	4,91E-05
	AT4G21390	S-locus lectin protein kinase family protein	-2,06	6,33E-04
	AT1G19020		-2,03	2,87E-10
	AT5G25930	Protein kinase family protein with leucine-rich repeat domain	-1,67	1,00E-06
	AT4G23190	Cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 11	-1,53	5,30E-07
	AT4G18880	Heat shock transcription factor	-1,26	1,19E-04
ClusterVII : RBOHF	AT5G01540	Lectin receptor kinase	-4,82	9,04E-03
	AT1G61340	F-box family protein	-4,15	2,29E-10
	AT3G50930	Cytochrome BC1 synthesis	-4,11	6,73E-03
	AT1G80840	WRKY DNA-binding protein 40	-3,19	1,16E-06
	AT5G59820	C2H2-type zinc finger family protein	-2,92	2,32E-19
	AT1G27730	Salt tolerance zinc finger	-2,86	3,97E-26

		AT5G52750	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein	-2,69	8,18E-07
		AT5G04340	Zinc finger of Arabidopsis thaliana 6	-2,42	3,32E-03
		AT1G07135	Glycine-rich protein	-2,37	1,77E-06
		AT2G38470	WRKY DNA-binding protein 33	-2,36	4,19E-04
		AT5G51190	Integrase-type DNA-binding superfamily protein	-2,28	3,10E-19
		AT2G40140	Zinc finger (CCCH-type) family protein	-2,22	4,84E-05
		AT5G47230	Ethylene responsive element binding factor 5	-2,19	5,14E-14
		AT5G27420	Carbon/nitrogen insensitive 1	-2,19	4,44E-07
		AT4G17490	Ethylene responsive element binding factor 6	-2,07	1,47E-11
		AT1G05575		-2,05	6,84E-05
		AT2G32030	Acyl-coa N-acyltransferases (NAT) superfamily protein	-2,01	1,90E-04
		AT1G23710	Protein of unknown function (DUF1645)	-1,79	3,79E-07
		AT4G23810	WRKY family transcription factor	-1,69	2,47E-05
	ClusterVIII : ROS_acclimation	AT5G52760	Copper transport protein family	-4,74	1,54E-02
		AT5G10380	RING/U-box superfamily protein	-1,80	4,18E-03
		AT3G52430	Alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	-1,79	7,51E-03
		AT5G18470	Curculin-like (mannose-binding) lectin family protein	-1,31	2,21E-02

Tableau 3 : Liste des gènes faisant partie de la méta-analyse de Willems et al. 2016 et retrouvés parmi les DEG dans les parties aériennes du mutant *tfl1*

	Cluster	Locus	Nom	Log ₂ FC	p-value
DOWN	ClusterIII : HL-early	AT5G42380	Calmodulin like 37	-4,75	9,22E-02
	ClusterII : HL-late	AT5G62210	Embryo-specific protein 3, (ATS3)	-0,86	6,65E-01
		AT5G13930	Chalcone and stilbene synthase family protein	9,07E-04	9,99E-01
UP	ClusterI : GUN-retrograde	AT4G02770	Photosystem I subunit D-1	1,12	7,51E-06
		AT2G27290	Protein of unknown function (DUF1279)	1,13	8,44E-03
		AT1G09340	Chloroplast RNA binding	1,17	8,35E-03
		AT1G15820	Light harvesting complex photosystem II subunit 6	1,19	6,24E-06
		AT4G05180	Photosystem II subunit Q-2	1,25	4,80E-07

	AT1G68010	Hydroxypyruvate reductase	1,27	4,16E-04
	AT5G01530	Light harvesting complex photosystem II	1,28	2,55E-09
	AT2G21330	Fructose-bisphosphate aldolase 1	1,29	1,38E-02
	AT1G51400	Photosystem II 5 kd protein	1,31	1,68E-07
	AT3G15840	Post-illumination chlorophyll fluorescence increase	1,32	2,25E-02
	AT1G52220	PTHR33222:SF3 - PROTEIN CURVATURE THYLAKOID 1C, CHLOROPLASTIC (1 of 1)	1,35	7,68E-04
	AT3G54050	High cyclic electron flow 1	1,37	2,97E-03
	AT1G03130	Photosystem I subunit D-2	1,40	1,17E-05
	AT2G20260	Photosystem I subunit E-2	1,41	1,70E-07
	AT1G08380	Photosystem I subunit O	1,41	8,05E-06
	AT4G09010	Ascorbate peroxidase 4	1,42	2,68E-02
	AT5G64040	Photosystem I reaction center subunit PSI-N, chloroplast, putative / PSI-N, putative (PSAN)	1,46	1,44E-07
	AT3G21055	Photosystem II subunit T	1,50	8,17E-05
	AT3G16140	Photosystem I subunit H-1	1,55	4,49E-06
	AT4G12800	Photosystem I subunit I	1,70	3,69E-08
	AT5G54270	Light-harvesting chlorophyll B-binding protein 3	1,74	5,82E-11
	AT1G55670	Photosystem I subunit G	1,75	1,70E-09
	AT4G28750	Photosystem I reaction centre subunit IV / psae protein	1,75	1,88E-07
	AT3G48420	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein	1,77	2,49E-02
	AT3G63140	Chloroplast stem-loop binding protein of 41 kda	1,83	2,31E-05
	AT1G52230	Photosystem I subunit H2	1,84	8,94E-05
	AT3G08940	Light harvesting complex photosystem II	1,98	7,24E-14
	AT1G76100	Plastocyanin 1	2,28	9,48E-04
	AT2G42220	Rhodanese/Cell cycle control phosphatase superfamily protein	2,32	1,52E-06
	AT1G21500		2,59	3,18E-03
	AT5G49360	Beta-xylosidase 1	1,08	2,88E-09
Cluster II : HL-late	AT4G27450	Aluminium induced protein with YGL and LRDR motifs	1,39	1,93E-07
	AT3G10020	PTHR12626//PTHR12626:SF7 - PROGRAMMED CELL DEATH 4 // SUBFAMILY NOT NAMED (1 of 1)	1,20	1,90E-06
	AT4G33220	Pectin methylesterase 44	1,32	1,54E-02
Cluster III : HL-early	AT1G69530	Expansin A1	1,72	3,76E-11

		AT1G78460	SOUL heme-binding family protein	2,10	5,85E-20
--	--	-----------	-------------------------------------	------	----------

Tableau 4 : Liste des gènes faisant partie de la méta-analyse de Willems *et al.* 2016 et retrouvés parmi les DEG dans les parties racinaires du mutant *tfl1*.

Dans un premier temps, nous remarquons qu'au sein des parties aériennes, la majorité des DEG sont sous-exprimés. Tandis qu'au niveau des racines, on observe une situation inverse. En comparant les DEG des parties aériennes et des racines, on constate que nous ne retrouvons aucun des DEG, détectés au sein des parties aériennes, dans les racines.

Les DEG détectés dans les parties aériennes du mutant *tfl1* font partie des clusters II, III, IV, V, VII, VIII. Nous pouvons constater qu'un nombre important de DEG font partie des clusters III et VII par rapport aux autres clusters (Figure 9 et tableau 3).

Le cluster III contient les profils d'expression obtenus suite à une exposition de courte durée (30 minutes à 2 heures) à une intensité lumineuse importante. Ainsi, chez le mutant *tfl1*, les gènes du clusters III sont sous-exprimés. Ces résultats sont assez surprenants car les intensités lumineuses utilisées pour créer les stress HL sont le plus souvent supérieures à $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Willems *et al.*, 2016), alors que les plantules *tfl1* utilisées pour l'analyse RNA-seq se trouvaient à une intensité de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. L'identification de DEG liés au stress par les fortes intensités lumineuses suggère donc que la sensibilité à la lumière du mutant *tfl1* serait différente du WT.

Le cluster VII regroupe les données obtenues suite à des études menées afin de déterminer l'impact de la NADPH oxydase RBOHF (RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG PROTEIN F) lors de stress oxydatif. Les NADPH oxydases membranaires catalysent la réaction d'oxydation du NADPH par l'oxygène O_2 , ce qui produit du NADP^+ , de H^+ et de O_2^- dans l'apoplasme. Ces deux derniers réagissent ensuite sous l'action de la superoxyde dismutase pour former du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , qui entre dans la cellule notamment via des aquaporines. Cette cascade de signalisation est initiée, notamment en réponse à des pathogènes, ou encore en réponse à l'acide abscissique. La famille des RBOH comporte 10 membres (RBOHA-J) chez *A.thaliana* ; RBOHF et RBOHD sont connus comme étant les principales NADPH oxydases impliquées dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques (Chapman *et al.*, 2019). Elles participent également à la cascade de signalisation par laquelle l'ABA induit

la fermeture des stomates. RBOHF a pour rôle de renforcer la production de ROS et d'accélérer la mort cellulaire.

Etant donné l'enrichissement en DEG du cluster VII dans la partie aérienne du mutant *tfl1*, il est légitime de se poser la question si l'expression du gène *RBOHF* est elle-même affectée par la mutation *tfl1*. La réponse est « non », mais le gène codant pour RBOHD est, lui, sous-exprimé chez le mutant *tfl1* ($\log_2FC = -2,7$). Les protéines RBOHF et RBOHD exercent des fonctions largement redondantes (Chapman *et al.*, 2019) ; le fait que de nombreux DEG soient communs aux mutants *tfl1* et *rboh* suggère donc que la fonction de *TFL1* pourrait s'exercer en partie via *RBOH* (F et/ou D). Il est intéressant de signaler que ces protéines ont été récemment impliquées dans la régulation de la distribution des ROS dans le méristème de tige et que cette distribution elle-même contrôle le maintien des cellules souches du SAM (Schippers *et al.*, 2016).

Dans les parties racinaires, nous retrouvons des DEG appartenant au cluster I principalement (Figure 9 et tableau 4). Toutefois, des gènes appartenant aux clusters II et III sont également détectés. Dans les clusters II et III, des gènes participant au développement des graines et des racines sont détectés. Il est important de noter qu'il n'y a aucun gène des clusters II et III détectés parmi les DEG dans les racines en commun avec les gènes de ces mêmes clusters détectés parmi les DEG dans les parties aériennes.

Le cluster I regroupe les données obtenues suite à des traitements affectant la biogenèse du chloroplaste et des profils d'expression du mutant *genomes uncoupled 1* (*gun1*) affecté dans la signalisation rétrograde du plaste. La communication entre le noyau et le plaste est régulée par un système de contrôle. Ce système de contrôle, appelé rétrograde, a été découvert lors de l'étude des mutants avec des chloroplastes morphologiquement anormaux. Une altération de l'expression des gènes nucléaires est observée lorsqu'on a une altération de la morphologie des plastes. Six allèles *gun* ont été identifiés chez *Arabidopsis* ; *gun2-6* sont affectés au niveau de gènes de la biosynthèse des tétrapyrroles tandis que *gun1* est déficient dans une protéine à domaine tétratricopeptide, encodée par le génome nucléaire (Hernandez-Verdeja et Strand, 2018). La protéine GUN1 agit comme un intégrateur de différents signaux d'origine chloroplastique impliqués dans le contrôle rétrograde de l'expression de gènes nucléaires (Inaba, 2010). Ces signaux sont des précurseurs de la chlorophylle, des ROS, des protéines encodées par le génome chloroplastique et des protéines régulant l'import dans les plastes. GUN1 contrôle l'import dans le noyau de plusieurs facteurs de transcription dont ABSCISIC

ACID INSENSITIVE 4 (ABI4), de même que l'import dans les plastes de protéines chaperonnes dont HEAT SHOCK PROTEIN 90 (HSP90) (Wu *et al.*, 2019).

Les racines étant des organes hétérotrophes, il est surprenant d'y trouver l'expression de gènes impliqués dans les communications entre chloroplastes et noyau. Cependant, il faut préciser que dans les conditions de culture *in vitro* utilisées pour la culture du mutant *tfl1*, les racines des plantules sont exposées à la lumière. Cette dernière peut induire le verdissement des racines et l'activation de gènes impliqués dans la photosynthèse. Chez *Arabidopsis*, le développement de chloroplastes dans les racines est réprimé par l'auxine mais stimulé par les cytokinines. Une réduction de l'import d'auxine dans les racines peut donc induire l'activation de gènes associés à la photosynthèse. Cette activation nécessite les facteurs de transcription LONG HYPOCOTYL5 (HY5) et GOLDEN2-LIKE (GLK2) qui activent les gènes nécessaires au verdissement des racines à la lumière (Kobayashi *et al.*, 2012). GUN1 contrôle l'import de HY et GLK2 dans le noyau (Wu *et al.*, 2019). L'expression différentielle de gènes photosynthétiques dans les racines a aussi été rapportée en réponse à une carence en phosphate (Kang *et al.*, 2014).

Bien que de nombreux DEG détectés dans les racines du mutant *tfl1* appartiennent au Cluster I « GUN-retrograde », aucun des gènes *GUN*, *ABI4*, *HY5* ou *RLK2* ne sont différentiellement exprimés dans les racines du mutant (résultats non montrés). Par contre le gène *YUC5*, impliqué dans la biosynthèse d'auxine et le gène *PIN5*, encodant un transporteur d'auxine, sont DOWN chez le mutant (tableau 1). L'activation de gènes liés à la photosynthèse dans les racines pourrait donc être due à une diminution de l'abondance en auxine. Enfin, il faut préciser que la régulation par GUN1 ne concerne pas que les gènes photosynthétiques mais aussi, d'une manière générale, la genèse des plastes (mise en place de leur machinerie de traduction, etc.). De plus, et sans que cela soit encore expliqué au niveau mécanistique, il a été rapporté récemment que la signalisation rétrograde passant par GUN1 est impliquée dans la croissance des racines (Garnik *et al.*, 2019).

3. CHAPITRE III : Conclusions et perspectives

La protéine TFL1 est un acteur majeur de la floraison, qui agit au sein des méristèmes de tiges afin de réprimer la différenciation des cellules souches en structure florale. Lors de l'étude des mécanismes d'action de TFL1, des interacteurs potentiels de la protéine ont été recherchés. Plusieurs protéines du peroxysome ont été identifiées parmi lesquelles : ABNORMAL INFLORESCENCE 1 (AIM1) et MULTIFUNCTIONAL PROTEIN2 (MFP2) intervenant dans la β -oxydation des lipides, CATALASE2 (CAT2) jouant un rôle dans la gestion du stress oxydatif ou encore INDOLE-3-BUTYRIC ACID (IBA), IBA RESPONSE3 (IBR3) intervenant dans la biosynthèse de l'auxine.

Le but de ce travail a été dès lors d'investiguer un lien possible entre TFL1 et le métabolisme du peroxysome, en particulier la biosynthèse d'auxine et le stress oxydatif.

Pour la première partie, nous avons réalisé quelques expériences visant à évaluer la sensibilité du mutant *tfl1* et du mutant surexpressueur *35S:TFL1* au précurseur d'auxine IBA. L'hypothèse était que si TFL1 interagit avec les enzymes de la conversion de l'IBA en auxine active AIA, la réponse biologique à l'IBA sera affectée par la perte de fonction ou la surexpression du gène. Pour ce faire, l'effet de l'IBA sur la croissance de la racine primaire de plantules d'*A.thaliana* de type sauvage (Col), du mutant *tfl1* et des surexpressieurs *35S:TFL1* a été étudié. Aucune différence n'a été observée entre les différents génotypes. Par conséquent, la réponse biologique à l'IBA ne semble pas être affectée par la perte de fonction ou la surexpression de *TFL1*. Il serait intéressant de confirmer ce résultat par le phénotypage d'un autre effet de l'IBA, par exemple sur l'initiation des racines latérales.

Pour la seconde partie, l'analyse transcriptomique du mutant *tfl1* préalablement réalisée dans le laboratoire de Physiologie végétale a été exploitée. L'analyse du transcriptome du mutant *tfl1* par RNA-seq a permis de détecter les DEG dans les parties aériennes et les racines chez le mutant *tfl1* par rapport au WT. En étudiant la liste des DEG, il a été constaté qu'un certain nombre de gènes intervenant dans les fonctions métaboliques du peroxysome telles que la biosynthèse d'hormones dont l'auxine, la β -oxydation des lipides, ou encore la gestion du stress oxydatif, étaient affectés par la mutation *tfl1*. La présence de ces DEG suggère que la mutation

tfll altère les fonctions métaboliques du peroxysoxe, de même que les voies de signalisation de l'acide jasmonique et de l'auxine.

Il était prévu de vérifier les résultats obtenus par le RNA-seq, en réalisant une RT-qPCR sur un certain nombre de gènes. Vu l'inaccessibilité du laboratoire pendant la pandémie Covid-19, le travail a été limité à une analyse théorique des résultats.

Dans un second temps, les données obtenues par le RNA-seq du mutant *tfll* réalisé dans le laboratoire ont été croisées avec la méta-analyse réalisée par F. Van Breusegem et son équipe afin de caractériser la signature transcriptomique du stress oxydatif. Il est frappant que dans le transcriptome du mutant *tfll*, il y a un enrichissement de certains « clusters de gènes » précédemment identifiés dans des analyses du stress oxydatif, mais les clusters sont différents dans les parties aériennes et dans les racines.

Dans les parties aériennes, un nombre important de DEG sont des gènes identifiés suite à un stress généré par de fortes intensités lumineuses ($>1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) suggérant que la sensibilité à la lumière du mutant *tfll* serait différente du WT. Cette hypothèse pourrait être testée facilement en cultivant les plantes à différentes intensités lumineuses et en mesurant leur état de stress, par exemple par des mesures de fluorescence de la chlorophylle. Ces manipulations étaient prévues initialement dans notre mémoire mais n'ont pas pu être réalisées.

Un second cluster de DEG sont communs au mutant *tfll* et *rboh*, bien que l'expression du gène *RBOHF* ne soit pas affectée par la mutation *tfll*. Cependant, le gène codant pour *RBOHD* est, lui, sous-exprimé chez le mutant *tfll*. Les protéines RBOHF et RBOHD génèrent des ROS dans l'apoplasme, en réponse à certains stimuli et exercent des fonctions en partie redondantes ; le fait que de nombreux DEG soient communs aux mutants *tfll* et *rboh* suggère donc que la fonction de *TFLI* pourrait s'exercer en partie via *RBOH* (*F* et/ou *D*). Il serait intéressant de réaliser des colorations ou d'utiliser des gènes rapporteurs senseurs de ROS afin d'étudier leur distribution dans le mutant *tfll*.

Les mutants *rboh*, *rboh* et *rboh rboh* étant disponibles, ils pourraient être croisés avec les mutants *tfll* ou les surexprimeurs de *TFLI* afin de détecter un lien potentiel entre ces gènes. Il serait aussi intéressant d'approfondir l'étude du lien entre *TFLI* et les ROS. Plusieurs approches, afin d'étudier le stress oxydatif chez le mutant *tfll*, pourraient être envisagées. Le

phénotype du mutant *tfl1* soumis à différents stress générant la production de ROS pourrait être caractérisé. Pour ce faire, les plantes peuvent être mises en culture dans des conditions environnementales induisant un stress oxydatif telles que la culture à une intensité lumineuse élevée ou dans des conditions de restriction de gaz. La production de ROS peut également être stimulée par des traitements chimiques avec du méthylviologène (MV) et le 3-aminotriazole (3-AT). Le MV génère une accumulation d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) en catalysant le transfert d'électrons du photosystème I vers l'oxygène moléculaire tandis que le 3-AT est un inhibiteur de la catalase et provoque une accumulation de H_2O_2 .

De manière assez surprenante, les DEG enrichis dans les racines du mutant *tfl1* ne sont pas les mêmes que dans les parties aériennes. Les DEG détectés dans les racines sont enrichis dans un cluster détecté dans le mutant *gun1*, affecté dans la signalisation rétrograde des plastes, et semblent indiquer une dérépression des gènes nécessaires à l'activité photosynthétique. Ces observations pourraient indiquer un dérèglement de la balance auxine/cytokinine qui contrôle le verdissement des racines. Bien que cette signalisation ait pour fonction essentielle de coordonner l'expression des gènes nucléaires et chloroplastiques lors du développement des chloroplastes, elle pourrait être impliquée dans d'autres fonctions notamment dans les racines.

En conclusion, nos analyses ne nous permettent pas de préciser un lien clair entre TFL1 et les fonctions du peroxysome, en particulier la synthèse d'auxine à partir d'IBA. Cependant, l'analyse du transcriptome du mutant *tfl1* suggère que de nombreux processus liés au stress oxydatif, tels que la réponse à de fortes intensités lumineuses, la synthèse de ROS par les protéines membranaires ROBH ou le développement des chloroplastes, sont modifiés. Le lien entre TFL1 et le stress oxydatif mérite donc des investigations supplémentaires. Cela est d'autant plus justifié que des analyses récentes mettent en évidence un rôle des ROS dans le maintien des méristèmes.

4. Bibliographie

Abe M, Kobayashi Y, Yamamoto S, Daimon Y, Yamaguchi A, Ikeda Y, Ichinoki H, Notaguchi M, Goto K, et Araki T, 2005, “FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex”, *Science*, Vol 309, pp 1052-1056

Amasino R, 2004, “Vernalization, competence, and the epigenetic memory of winter”, *The Plant Cell*, Vol 16, pp 2553-2559

Amasino R, 2010, “Seasonal and developmental timing of flowering”, *The Plant Journal*, Vol 61, pp 1001-1013

Aoki S, Toh S, Nakamichi N, Yuki Hayashi Y, Yin Wang Y, Suzuki T, Tsuji H et Kinoshita T, 2019, “Regulation of stomatal opening and histone modification by photoperiod in *Arabidopsis thaliana*”, *Scientific Reports*, Vol 9 : 10054

Baumann K, Venail J, Berbel A, Domenech M J, Money T, Conti L, Hanzawa Y, Madueno F, et Bradley D, 2015, “Changing the spatial pattern of *TFL1* expression reveals its key role in the shoot meristem in controlling *Arabidopsis* flowering architecture”, *Journal of Experimental Botany*, Vol 66, pp 4769-4780

Bauwe H, Hagemann M, et Fernie A, 2010, “Photorespiration: players, partners and origin”, *Trends in Plant Science*, Vol 15, pp 330-336

Benjamins R et Scheres B, 2008, “Auxin: The looping star in plant development.”, *Annual Review of Plant Biology*, Vol 59, pp 443–465

Bernier G et Périlleux C, 2005, “A physiological overview of the genetics of flowering time control”, *Plant Biotechnology Journal*, Vol 3, pp 3-16

Blanvillain R, Kim JH, Wu S, Lima A, et Ow DW, 2009, “OXIDATIVE STRESS 3 is a chromatin-associated factor involved in tolerance to heavy metals and oxidative stress”, *The Plant Journal*, Vol 57, pp 654-665

Bouché F, D'aloia M, Tocquin P, Lobet G, Detry N et Périlleux C, 2016, “Integrating roots into a whole plant network of flowering time genes in *Arabidopsis thaliana*”, Scientific Reports, Vol 6:29042

Bouché F, Lobet G, Tocquin P et Périlleux C, 2016, “FLOR-ID: an interactive database of flowering-time gene networks in *Arabidopsis thaliana*”, Nucleic Acids Research, 44(D1) D1167-71

Bradley D, Ratcliffe O, Vincent C, Carpenter R, et Coen E, 1997, “Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*”, Science, Vol 275, pp 80–83

Conti L et Bradley D, 2007, “TERMINAL FLOWER1 Is a Mobile Signal Controlling *Arabidopsis* Architecture”, The Plant Cell, Vol 19, pp 767-778

Corbesier L et Coupland G, 2006, “The quest for florigen: Review of recent progress”, Journal of Experimental Botany, Vol 57, pp3395-3403

Corpas F J, 2015, “What is the role of hydrogen peroxide in plant peroxisomes?”, Plant Biology, Vol 17, pp 1099–1103

Corpas F J, Gonzalez-Gordo S, et Palma J M, 2020, “Plant Peroxisomes: A Factory of Reactive Species”, Frontiers in Plant Sciences, Vol 11:853

Damodaran S et Strader L C, 2019, “Indole 3-Butyric Acid Metabolism and Transport in *Arabidopsis thaliana*”, Frontiers in Plant Science, Vol 10: 851

Foyer C, 2018, “Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis”, Environmental and Experimental Botany, Vol 154, pp 134-142

Foyer C, et Noctor G, 2009, “Redox Regulation in Photosynthetic Organisms: Signaling, Acclimation, and Practical Implications”, Antioxydants and Redox Signaling, Vol 11, pp 861-905

Frick E et Strader L C, 2018, “Indole 3-Butyric Acid Metabolism and Transport in *Arabidopsis thaliana*”, *Journal of Experimental Botany*, Vol 69, pp 169-177

Garnik EY, Tarasenko V I, Gorbunova A I, Shmakov V N, et Konstantinov Y M, 2019, “Genome uncoupled (*gun*) phenotype is associated with root growth repression in *Arabidopsis* seedlings grown on lincomycin”, *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, Vol 31, pp 445–454

Hanano S et Goto K, 2011, “*Arabidopsis TERMINAL FLOWER1* Is Involved in the Regulation of Flowering Time and Inflorescence Development through Transcriptional Repression”, *The Plant Cell*, Vol 23, pp 3172-3184

Hanzawa Y, Money T, et Bradley D, 2005, “A single amino acid converts a repressor to an activator of flowering”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol 102, pp 7748-7753

Hauck O K, Scharnberg J, Escobar N M, Wanner G, Giavalisco P, et Witte C P, 2014, “Uric acid accumulation in an *Arabidopsis* urate oxidase mutant impairs seedling establishment by blocking peroxisome maintenance”, *The Plant Cell*, Vol 26, pp 3090–3100

Hernández-Verdeja T, et Strand Å, 2018, “Retrograde Signals Navigate the Path to Chloroplast Development”, *Plant Physiology*, Vol 176, pp 967-976

Hu J, Baker A, Bartel B, Linka N, Mullen R T, Reumann S, et Zolman B K, 2012, “Plant peroxisomes: biogenesis und function”, *The Plant Cell*, Vol 24, pp 2279-2303

Huang H, Ullah F, Zhou DX, Yi M, et Zhao Y, 2019, “Mechanisms of ROS Regulation of Plant Development and Stress Responses”, *Frontiers in Plant Sciences*, Vol 10:800

Inaba T, 2010, “Bilateral communication between plastid and the nucleus: plastid protein import and plastid-to-nucleus retrograde signaling” *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Vol 74, pp 471-476

Inoue S-I et Ki,oshita T, 2017, “Blue Light Regulation of Stomatal Opening and the Plasma Membrane H⁺-ATPase”, *Plant Physiology*, Vol 174, pp 531-538

Irish V F, 2010, “The flowering of *Arabidopsis* flower development”, *The Plant Journal*, Vol 61, pp 1014-102

Jaeger K E, Pullen N, Lamzin S, et al, 2013, “Interlocking Feedback Loops Govern the Dynamic Behavior of the Floral Transition in *Arabidopsis*”, *The Plant Cell*, Vol 25, pp 820–833

Kang J, Yu H, Tian C, Zhou W, Li C, Jiao Y, Liu D, 2014, “Suppression of Photosynthetic Gene Expression in Roots Is Required for Sustained Root Growth under Phosphate Deficiency”, *Plant Physiology*, Vol 165, pp 1156-1170

Kao Y-T, Gonzalez K L, et Bartel B, 2018, “Peroxisome Function, Biogenesis, and Dynamics in Plants”, *Plant Physiology*, Vol 176, pp 162-177

Kaul S, Koo H L, Jenkins J, Rizzo M, Rooney T, Tallon L J, Feldblyum T, Nierman W, Benito M I, Lin X, Town C D, J. Craig Venter, Fraser C M, Tabata S, Nakamura Y, Kaneko T, Sato S, Asamizu E, Kato T, Kotani H *et al.*, 2000, “Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*.”, *Nature*, Vol 408, pp 796–815

Kindl H, 1993, “Fatty acid degradation in plant peroxisomes: Function and biosynthesis of the enzymes involved”, *Biochimie*, Vol 75, pp 222-230

Kinoshita T et Shimazaki K, 1999, “Blue light activates the plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells.”, *The EMBO Journal*, Vol 18, pp 5548–5558

Kinoshita T, Ono N, Hayashi Y, Morimoto S, Nakamura S, Soda M, Kato Y, Ohnishi M, Nakano T, Inoue S-I, et Shimazaki K-I, 2011, “*FLOWERING LOCUS T* Regulates Stomatal Opening”, *Current Biology*, Vol 21, pp 1232-1238

Kobayashi K, Baba S, Obayashi T, Sato M, Toyooka K, Keränen M, Aro EM, Fukaki H, Ohta H, Sugimoto K, et Masuda T, 2012, “Regulation of Root Greening by Light and Auxin/Cytokinin Signaling in *Arabidopsis*”, *The Plant Cell*, Vol 24, pp 1081-1095

Kobayashi Y, Kaya H, Goto K, Iwabuchi M, et Takashi Araki T, 1999, “A Pair of Related Genes with Antagonistic Roles in Mediating Flowering Signals”, *Sciences*, Vol. 286, pp. 1960-1962

Korasick DA, Enders TA et Strader LC, 2013, “Auxin biosynthesis and storage forms”, *Journal of Experimental Botany*, Vol 64, pp2541-2555

Lachowiec J, Shen X, Queitsch C et Carlborg Ö, 2015, “A Genome-wide association analysis reveals epistatic cancellation of additive genetic variance for root length in *Arabidopsis thaliana*”, *PLOS Genetics* 11(9): e1005541

Liang M, Xiao S, Cai J et Ow DW, 2019, “OXIDATIVE STRESS 3 regulates drought-induced flowering through *APETALA 1*”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol 519, pp 585-590

Liljegren S J, Gustafson-Brown C, Pinyopich A, Ditta G S, et Yanofsky M F, 1999, “Interactions among *APETALA1*, *LEAFY*, and *TERMINAL FLOWER1* specify meristem fate”, *The Plant Cell*, Vol 11, pp 1007-1018

Liu YY, Yang KZ, Wei XX, et Wang XQ, 2016, “Revisiting the phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP) gene family reveals cryptic *FLOWERING LOCUS T* gene homologs in gymnosperms and sheds new light on functional evolution”, *New Phytologist*, Vol 212, pp 730-744

Mano Y et Nemoto K, 2012, “The pathway of auxin biosynthesis in plants”, *Journal of Experimental Botany*, Vol 63, pp 2853-2872

Mateos JL, Madrigal P, Tsuda K, Rawat V, Richter R, Romera-Branchat M, Fornara F, Schneeberger K, Krajewski P, et Coupland G, 2015, “Combinatorial activities of *SHORT*

VEGETATIVE PHASE and FLOWERING LOCUS C define distinct modes of flowering regulation in *Arabidopsis*”, *Genome Biology*, Vol 16, Article 31

Meinke W.D, Cherry JM, Dean C., Rounsley ST., Koornneef M., 1998, “*Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis”, *Science*, Vol 282, pp 662-682

Michaels SD et Amasino RM, 1999, “*FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering.”, *Plant Cell.*, Vol 11, pp 949–956

Nito K., Kamigaki A., Kondo M., Hayashi M., et Nishimura M., 2007, “Functional classification of *Arabidopsis* peroxisome biogenesis factors proposed from analyses of knockdown mutants.”, *Plant and Cell Physiology*, pp 763–774

Périlleux C, Bouché F, Randoux M, et Orman-Ligeza B, 2019, “Turning meristems into fortresses”, *Trends in Plant Science*, Vol 24, pp 431-442

Poirier Y, Antonenkov VD, Glumoff T, et Hiltunen JK, 2006, “Peroxisomal beta-oxidation—a metabolic pathway with multiple functions”, *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol 1763 pp 1413-1426

Poupart J et Waddell C S, 2000, “The *rib1* Mutant Is Resistant to Indole-3-Butyric Acid, an Endogenous Auxin in *Arabidopsis*”, *Plant Physiology*, Vol 124, pp 1739-1751

Putterill J, Laurie R, et Macknight R., 2004, “It's time to flower: the genetic control of flowering time”, *Bioessays*, Vol 26, pp 363-373

Ratcliffe O J, Bradley D J, et Coen E S, 1999, “Separation of shoot and floral identity in *Arabidopsis*”, *Development*, Vol 126, pp 1109-1120

Ratcliffe O, Amaya I, Vincent C, Rothstein S, Carpenter R, Coen ES, et Bradley DJ, 1998, “A common mechanism controls the life and architecture of cell plants”, *Development*, Vol 125, pp 1609-1615

Rinaldi MA, Patel AB, Park J, Lee K, Strader LC, et Bartel B, 2016, “The Roles of β -Oxidation and Cofactor Homeostasis in Peroxisome Distribution and Function in *Arabidopsis thaliana*”, *Genetics*, Vol 204, pp 1089-1115

Ruiz-Garcia, L, Madueno, F, Wilkinson, M, Haughn, G, Salinas J, et Martinez-Zapater, J.M, 1997, “Different roles of flowering-time genes in the activation of floral initiation genes in *Arabidopsis*”, *Plant Cell*, Vol 9, pp 1921–1934

Rylott EL, Eastmond PJ, Gilday AD, Slocombe SP, Larson TR, Baker A, et Graham IA, 2006, “The *Arabidopsis thaliana* multifunctional protein gene (*MFP2*) of peroxisomal beta-oxidation is essential for seedling establishment.”, *The Plant Journal*, Vol 45, pp 930–941

Schippers J HM, Foyer C, et Van Dongen J T, 2016, “Redox regulation in shoot growth, SAM maintenance and flowering”, *Current Opinion in Plant Biology*, Vol 29, pp 121-128

Schultz E, et Haughn G, 1993, “Genetic analysis of the floral initiation process (FLIP) in *Arabidopsis*”, *Biology*, Vol 119, pp 745-765

Seranno-Mislata A, Fernandez-Nohales P, Doménech MJ, Hanzawa Y, Bradley D, et Madueño F, 2016, “Separate elements of the *TERMINAL FLOWER 1* cis-regulatory region integrate pathways to control flowering time and shoot meristem identity”, *Development*, Vol 143, pp 3315-3327

Shannon S, Meeks-Wagner D R., 1991, “A Mutation in the *Arabidopsis TFL1* Gene Affects Inflorescence Meristem Development.”, *The Plant Cell*, Vol 3, pp 877-892

Simon R., Igeno I M. et Coupland G, 1996, “Activation of floral meristem identity genes in *Arabidopsis*”, *Nature*, Vol 384, pp 59-62

Song L, Chen Z, et Larkin R M, 2018, “The genomes uncoupled Mutants Are More Sensitive to Norflurazon Than Wild Type”, *Plant Physiology*, Vol 178, pp 965-971

Su T, Li W, Wang P, et Ma C, 2019, “Dynamics of Peroxisome Homeostasis and Its Role in Stress Response and Signaling in Plants”, *Frontiers in Plant Sciences*, Vol 10:705

Sung S et Amasino R M, 2004, “Vernalization and epigenetics: how plants remember winter”, *Current Opinion in Plant Biology*, Vol 7, pp 4-10

Takahashi K, Shimada T, Kondo M, Tamai A, Mori M, Nishimura M, et Hara-Nishimura I, 2010, “Ectopic expression of an esterase, which is a candidate for the unidentified plant cutinase, causes cuticular defects in *Arabidopsis thaliana*”, *Plant Cell Physiology*, Vol 51, pp 123-131

Taoka K, Ohki I, Tsuji H, Furuita K, Hayashi K, Yanase T, Yamaguchi M, Nakashima C, Purwestri Y A, Tamaki S, Ogaki Y, Shimada C, Nakagawa A, Kojima C, et Shimamoto K, 2011, “14-3-3 Proteins act as intracellular receptors for rice Hd3a florigen”, *Nature*, Vol 476, pp 332–335

Valverde F, Mouradov A, Soppe W, Ravenscroft D, Samach A, et Coupland G, 2004, “Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering”, *Science*, Vol 303, pp 1003-1006

Weigel D, Alvarez J, Smyth D R, Yanofsky M F, Meyerowitz E M, 1992, “*LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*”, *Cell Press*, Vol 69, pp 843-859

Werck-Reichhart D, et Feyereisen R, 2000, “Cytochromes P450: a success story”, *Genome Biology*, Vol 1 (6), 1–3003.9

Wigge P.A., Kim M.C., Jaeger K.E., Busch W., Schmid M., Lohmann J.U., Weigel D., 2005, “Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*”, *Science*, Vol 309, pp 1056–1059

Wu GZ, Meyer EH, Richter AS, Schuster M, Ling Q, Schöttler MA, Walther D, Zoschke R, Grimm B, Jarvis RP, et Bock R, 2019, “Control of retrograde signalling by protein import and cytosolic folding stress”, *Nature Plants*, Vol 5, pp 525-538

Xuan W, Audenaert D, Parizot B, Möller B K, Njo M F, De Rybel B, De Rop G, Van Isterdael G, Mähönen A P, Vanneste S, et Beeckman T, “Root Cap-Derived Auxin Pre-patterns the Longitudinal Axis of the *Arabidopsis* Root”, *Current Biology*, Vol 25, 2015, pp 1381-1388

Yanagisawa S, 2002, “The Dof family of plant transcription factors ”, *Trends in Plant Science* Vol 7, pp 555–560

Yoo SK, Chung KS, Kim J, Lee JH, Hong SM, Yoo SJ, Yoo SY, Lee JS, et Ahn JH, “CONSTANS activates SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 through FLOWERING LOCUS T to promote flowering in *Arabidopsis*”, *Plant Physiology*, Vol 139, pp 770-778

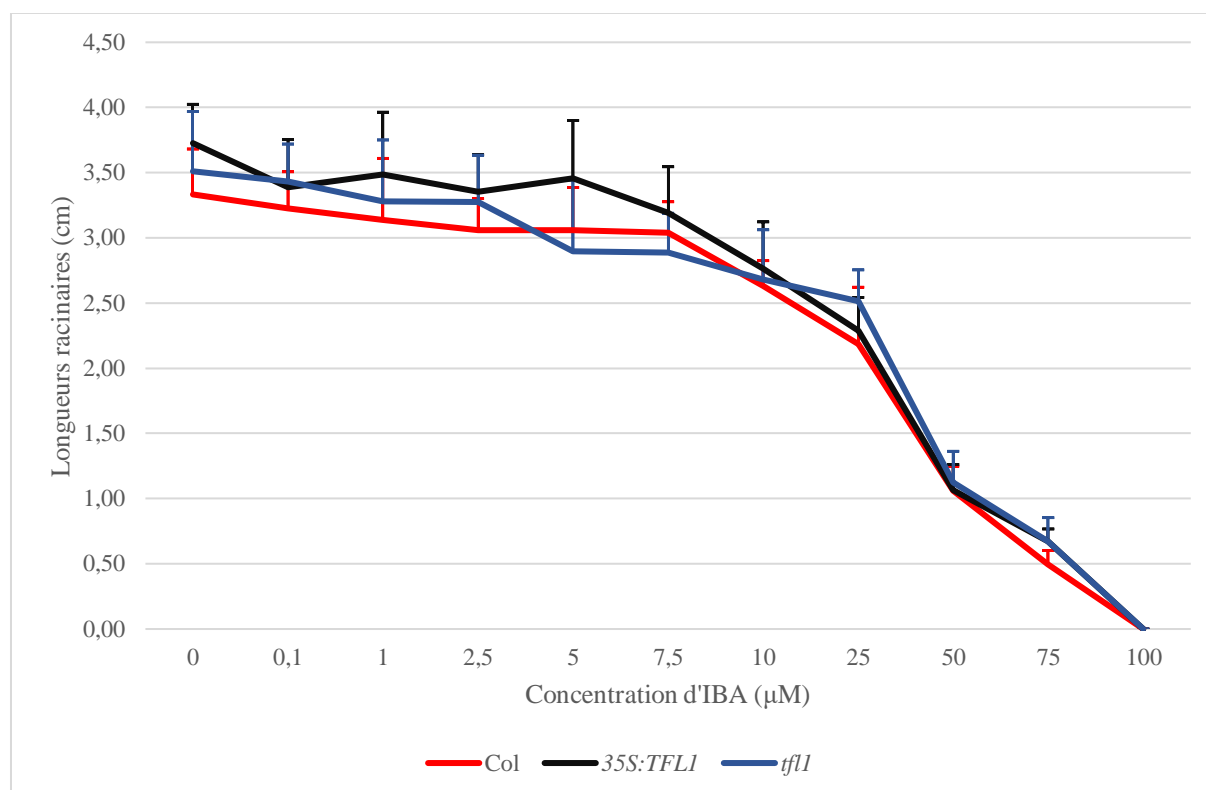
5. Annexe

Annexe 1 : Métabolisme de l'auxine

Données de l'effet de l'IBA sur la croissance de la racine primaire de plantules d'*A. thaliana* ; comparaison des génotypes de type sauvage (Col), du mutant *tfl1* et des surexprimeurs *35S:TFL1*. Les mesures ont été réalisées sur des plantules de 10 jours, semées directement sur milieu 0,5x MS, 1% saccharose, contenant différentes concentrations en IBA. Longueurs racinaires : cm ; Concentration d'IBA : μM

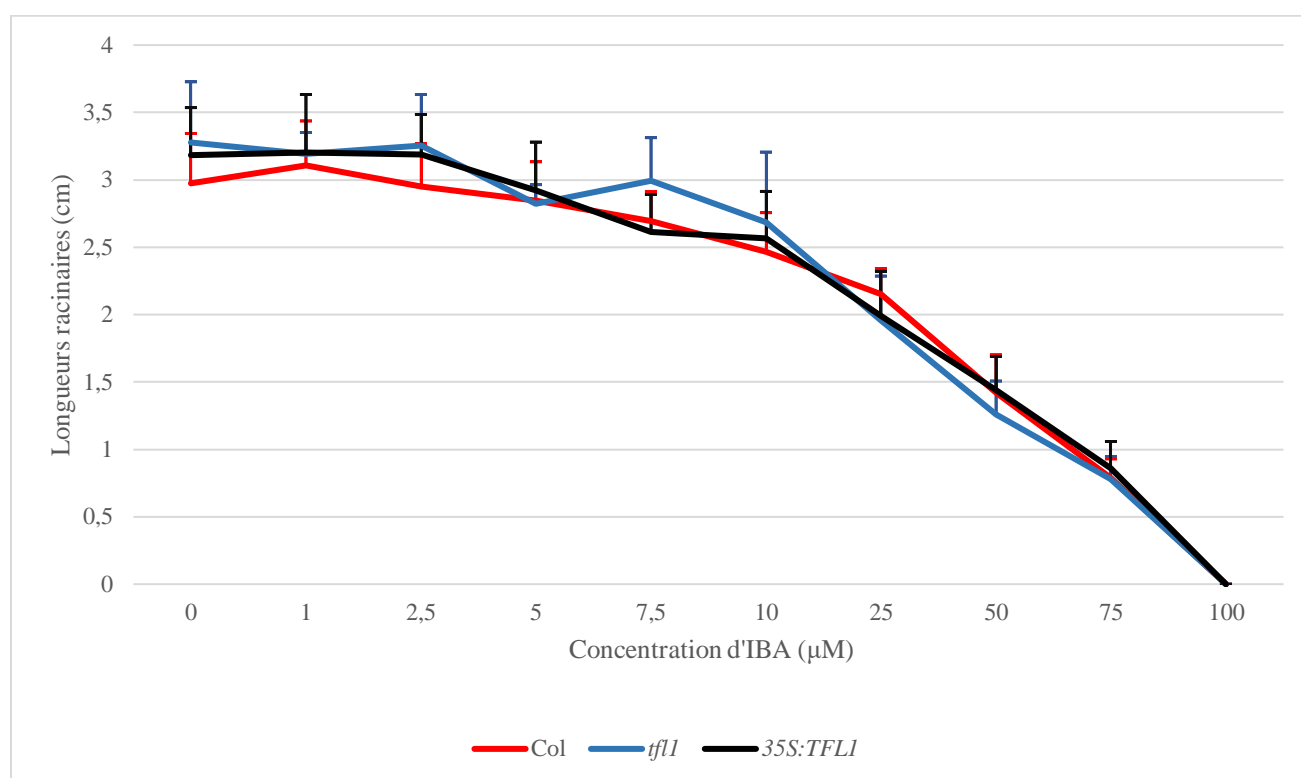
Expérience 1 :

Concentration d'IBA (μM)	<i>Col</i>	<i>35S:TFL1</i>	<i>tfl1</i>
0	$3,33 \pm 0,35$	$3,73 \pm 0,30$	$3,51 \pm 0,46$
0,1	$3,23 \pm 0,28$	$3,39 \pm 0,36$	$3,43 \pm 0,29$
1	$3,14 \pm 0,47$	$3,48 \pm 0,48$	$3,28 \pm 0,47$
2,5	$3,06 \pm 0,24$	$3,35 \pm 0,29$	$3,27 \pm 0,36$
5	$3,06 \pm 0,33$	$3,45 \pm 0,45$	$2,90 \pm 0,55$
7,5	$3,04 \pm 0,24$	$3,19 \pm 0,35$	$2,89 \pm 0,30$
10	$2,63 \pm 0,19$	$2,76 \pm 0,36$	$2,68 \pm 0,38$
25	$2,19 \pm 0,44$	$2,29 \pm 0,27$	$2,51 \pm 0,24$
50	$1,06 \pm 0,18$	$1,06 \pm 0,20$	$1,13 \pm 0,24$
75	$0,49 \pm 0,11$	$0,67 \pm 0,09$	$0,67 \pm 0,18$
100	0 ± 0	0	0



Expérience 2 :

Concentration d'IBA (μM)	<i>Col</i>	<i>35S:TFL1</i>	<i>tfl1</i>
0	2,98 \pm 0,37	3,19 \pm 0,35	3,28 \pm 0,45
1	3,11 \pm 0,33	3,20 \pm 0,43	3,19 \pm 0,16
2,5	2,95 \pm 0,32	3,19 \pm 0,30	3,25 \pm 0,38
5	2,84 \pm 0,29	2,92 \pm 0,36	2,82 \pm 0,14
7,5	2,69 \pm 0,22	2,61 \pm 0,28	2,99 \pm 0,32
10	2,47 \pm 0,29	2,57 \pm 0,35	2,69 \pm 0,52
25	2,15 \pm 0,19	1,99 \pm 0,33	1,96 \pm 0,33
50	1,42 \pm 0,28	1,44 \pm 0,25	1,26 \pm 0,25
75	0,79 \pm 0,14	0,86 \pm 0,20	0,78 \pm 0,17
100	0	0	0



Répétition 3 :

Concentration d'IBA (μM)	<i>Col</i>	<i>35S:TFL1</i>	<i>tfl1</i>
0	3,14 \pm 0,24	3,57 \pm 0,34	3,33 \pm 0,29
1	3,33 \pm 0,42	3,36 \pm 0,44	3,31 \pm 0,36
2,5	3,29 \pm 0,32	3,33 \pm 0,31	3,41 \pm 0,52
5	2,97 \pm 0,29	2,71 \pm 0,49	2,77 \pm 0,38
7,5	2,6 \pm 0,25	2,59 \pm 0,36	2,67 \pm 0,37
10	2,46 \pm 0,30	2,64 \pm 0,31	2,69 \pm 0,39
25	2,05 \pm 0,21	1,76 \pm 0,34	2,01 \pm 0,46
50	1,52 \pm 0,25	1,29 \pm 0,36	1,54 \pm 0,22
75	0,82 \pm 0,15	0,88 \pm 0,18	0,91 \pm 0,11
100	0	0	0

