

Travail encadré de recherche (TER)

Licence 3 - Sciences et Vie de la Terre
Parcours Sciences des productions végétales

Étudiant : **Valentin GOUPILLE**

Tuteur : **Anis LIMAMI**

La vernalisation chez *Arabidopsis thaliana* : Focus sur la régulation via FLC

Université d'Angers
Faculté des sciences
2 boulevard Lavoisier
49045 ANGERS Cedex 01

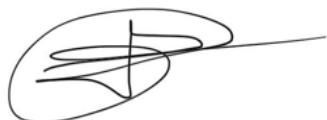


2021-2022

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné (e) **GOUPILLE Valentin**,
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un
document publiés sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation
des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer
toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire.

Signature :



Cet engagement de non plagiat doit être inséré en première page de tous les rapports, dossiers, mémoires.

Table des matières

Introduction.....	1
I- Implication des gènes FLOWERING LOCUS C et FRIGIDA dans la vernalisation chez <i>Arabidopsis thaliana</i>.....	2
1°) Intervention de FLC et FRI dans la floraison.....	2
2°) Expression de FLC et son interaction avec FRI.....	3
3°) L'effet de la vernalisation sur l'expression de FLC.....	4
II- Répression de l'activité du gène FLOWERING LOCUS C via l'intervention de différents gènes et acteurs moléculaires.....	5
1°) Découverte des 3 premiers gènes intervenants dans la répression de l'activité du gène FLOWERING LOCUS C.....	5
A- Découverte de l'intervention de VERNALIZATION INSENSITIVE3 (VIN3).....	5
B- Découverte de l'intervention des gènes VERNALIZATION1 (VRN 1) et VERNALIZATION2 (VRN2).....	6
2°) Intervention d'autres acteurs moléculaires.....	8
A- Polycomb Repressive Complexe 2 (PRC2) et VIL1.....	8
B- Intervention des ARN COLDAIR et COOLAIR.....	8
3°) Mécanisme général de l'inhibition de l'expression de FLC par la vernalisation.....	12
Conclusion.....	13

Introduction

La floraison est souvent une étape clef dans la vie et le cycle de développement des plantes. En effet, c'est elle qui permet la reproduction sexuée des Angiospermes via la formation de fruits contenant des graines. Or, dans nos régions tempérées, c'est très régulièrement au printemps que les plantes se mettent à fleurir.

Mais comment expliquer le déclenchement de la floraison à cette période bien précise ?

Nous savons que la transition entre la phase végétative et la phase reproductive est un processus complexe qui dépend aussi bien de facteurs internes que de facteurs externes. Ainsi, la transition florale est régulée à la fois par des signaux endogènes tels que l'âge ou le stade de développement de la plante mais également par des conditions environnementales favorables, comme l'arrivée de jours plus longs et/ou d'une température suffisamment élevée.

Cependant, nous savons également depuis longtemps que de nombreuses plantes voient leur floraison favorisée ou ont nécessairement besoin d'être exposées à des températures basses durant une durée plus ou moins longue (en général 1-7°C ; durant quelques semaines à 3 mois) pour induire leur floraison. Ce phénomène est appelé la vernalisation.

Par ailleurs, nous retrouvons ce mécanisme chez de nombreux végétaux, et particulièrement chez de nombreuses plantes cultivées de nos régions tempérées tel que les blés d'hiver qui doivent impérativement être semés à l'automne et subir le froid hivernal afin d'assurer leur floraison au printemps. La compréhension des mécanismes de floraison et notamment ceux de la vernalisation est essentielle pour optimiser les rendements des récoltes via l'amélioration variétale. C'est ainsi que la vernalisation a été largement étudié chez le modèle végétal le plus célèbre qui n'est d'autre qu'*Arabidopsis thaliana*.

Dans cette étude, nous chercherons à comprendre quels sont les mécanismes physiologiques et moléculaires responsables de la vernalisation chez *Arabidopsis thaliana*.

Dans un premier temps, nous allons présenter l'implication des gènes FLOWERING LOCUS et FRIGIDA dans la vernalisation chez cette espèce.

Enfin dans un second temps, nous traiterons de la répression de l'activité du gène FLOWERING LOCUS C via l'intervention de différents gènes et acteurs moléculaires.

I- Implication des gènes FLOWERING LOCUS C et FRIGIDA dans la vernalisation chez *Arabidopsis thaliana*

1°) Intervention de FLC et FRI dans la floraison

Arabidopsis thaliana est depuis longtemps une plante modèle pour étudier de nombreux aspects du développement des plantes dont la floraison.

Chez cette plante, il existe deux grandes catégories d'écotypes. Il y a d'abord les « annuelles d'été » et les « annuelles d'hiver ». La première catégorie comprend les écotypes à floraison précoce qui sont peu ou moyennement sensibles à la vernalisation, parmi cette catégorie on retrouve Columbia (Col) qui est un écotype à floraison moyenne et Landsberg erecta (Ler) qui lui possède une floraison précoce (Michaels *et al*, 1999). Cette catégorie d'*Arabidopsis thaliana* possède l'avantage de posséder un cycle de vie très court. La seconde catégorie regroupe les écotypes à floraison tardive mais ceux-ci présentent une forte réponse florale aux basses températures, c'est-à-dire que si ces écotypes subissent sont exposés à un période de froid, la transition florale est induite précocement. L'écotype San Feliu (SF) fait partie intégrante de cette seconde catégorie.

Grâce à des analyses mutationnelles, de nombreux gènes pouvant influencer sur la durée nécessaire pour induire la floraison chez *Arabidopsis thaliana* ont été identifiés. Parmi ces gènes, il y a notamment FLOWERING LOCUS (FLC) et FRIGIDA (FRI) (Michaels *et al*, 1999).

Pour étudier ces gènes et voir si ceux-ci sont impliqués plus spécifiquement dans les mécanismes de la vernalisation, Michaels et Amasino ont utilisé différents écotypes de cette espèce. Les chercheurs ont d'abord découvert que l'écotype SF qui possède une floraison tardive et est sensible à la vernalisation contient des allèles dominants de FRI et de FLC tandis que les écotypes à floraison plus précoce (Col et Ler) contiennent des allèles fri et/ou flc récessifs. Pour démontrer que la différence de floraison entre ces différents écotypes s'explique bien par la diversité allélique pour ces deux gènes FLC et FRI, et non par d'autres facteurs entre les différents écotypes, les scientifiques ont utilisé diverses méthodes d'analyses.

Ceux-ci ont notamment commencé par effectuer de nombreux croisements de type Backcross pour introduire les deux allèles dominant du gène FRI provenant de SF (écotype à floraison tardive en absence de vernalisation) dans un fond génétique Col qui possède à l'origine deux allèles récessifs du gène fri (écotype à floraison moyenne). Ceci leur a permis d'obtenir une descendance ayant un génotype FRISF2/FRI-SF2 FLC/FLC. Ainsi, Ils ont d'abord découvert que l'introduction de ces deux allèles dominant de FRI provenant de SF dans un fond génétique de type Col permettait de retarder la floraison (Tableau I). Ensuite, ils ont fait muter le gène FLC d'une partie de cette descendance afin d'obtenir des individus de génotype FRI-SF2/FRISF2 ; *f1c-3/f1c-3*, c'est-à-dire des individus dont ce gène FLC ne s'exprime plus (Figure 1).

Tableau I : Temps de floraison des différentes lignées d'*Arabidopsis thaliana*

(Mesurées en nombre de feuilles apparue avant que les plantes ne fleurissent)

(Traduit de Michaels *et al*, 1999)

Lignée	Nombre moyen de feuille au moment de la floraison	Description
Col	12,2	Col type sauvage fri-Col / fri-Col ; <i>FLC</i> -Col / <i>FLC</i> -Col)
FRI-SFR2 dans Col	67,8	Homozygote pour l'allèle SF2 de FRI dans le fond Col, dérivé du huitième rétrocroisement (backcross) (FRI -SF2/ FRI -SF2 ; <i>FLC</i> -Col/ <i>FLC</i> -Col)
<i>flc</i> -3 dans FRI-SF2 dans Col	11,3	Allèle muté <i>flc</i> dans <i>FRI</i> -SF2 dans le fond Col (FRI -SF2/ FRI -SF2 ; <i>flc</i> -3/ <i>flc</i> -3)

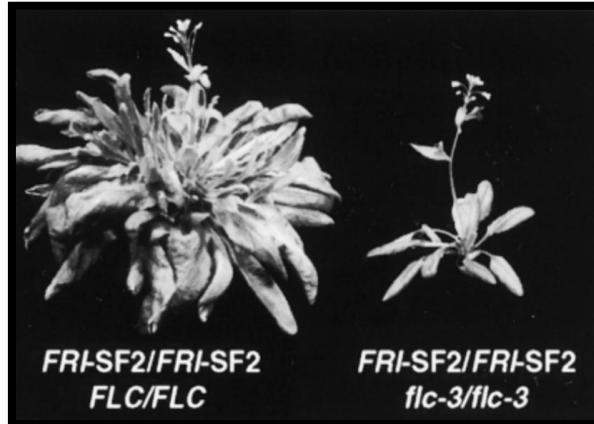


Figure 1 : Phénotype de floraison de différents individus d'*Arabidopsis thaliana* de même génotype

sauf pour le gène FLC

(Michaels *et al*, 1999)

-A gauche : individu FRI-SF2 dans un fond génétique de type Col, celui-ci possède une floraison tardive

-A droite : individu de même génotype sauf pour le gène FLC où celui-ci possède les 2 allèles mutés de ce gène, celui-ci possède une floraison plus précoce

Les chercheurs ont observé que les descendants dont le gène FLC est muté possèdent une floraison bien plus précoce que les descendants ayant un gène FLC actif. Ainsi, la floraison extrêmement tardive de l'individu possédant FRI-SF2 dans un fond génétique Col est éliminée en présence de mutations *flc*. Ceci démontre que le rôle du gène FLC est de réprimer la floraison.

Pour confirmer le rôle de ce gène, Michael et Amasino ont effectué une construction génétique. En effet, ceux-ci ont inséré un gène FLC induit par un promoteur (35S) s'exprimant de manière constitutive dans une plante ayant habituellement un écotype à floraison précoce (Ler) (Figure 2). Ils ont remarqué que la surexpression de FLC est suffisante pour retarder la floraison en l'absence d'un allèle FRI actif.

Ainsi, ces deux expérimentations ont permis d'affirmer que les gènes FRI et FLC interagissent en synergie pour retarder la floraison.

2°) Expression de FLC et son interaction avec FRI

Michaels et Amasino ont ensuite cherché à comprendre le rôle et l'interaction de ces deux gènes dans l'induction de la floraison.

Pour cela, ils ont commencé à isoler le gène FLC et déterminer pour quel type de protéine il code. Ainsi, ils ont découvert que celui-ci codait pour un facteur de transcription à boîte MADS.

Ensuite, en utilisant la technique de Northern Blot, ils ont analysé l'expression de FLC dans diverses conditions (Figure 3). Ainsi, ils ont notamment remarqué que les niveaux d'ARNm de FLC sont régulés positivement par l'allèle dominant de FRI (Figure 3A). Ainsi, cela démontre que le gène FRI participe à stimuler l'expression du gène FLC qui contribue à retarder la floraison. Grâce à cette méthode, ils ont pu également démontrer que le taux d'ARN de FLC ne variait pas en fonction de la photopériode (Figure 3B). D'ailleurs, ils ont remarqué que FLC s'exprime principalement au niveau des apex végétatifs et dans les tissus racinaires. Mais que des ARNm de FLC sont également détectables dans les feuilles et les tiges. (Figure 3C) De plus, les chercheurs ont remarqué que dans les jeunes tissus de l'inflorescence, l'ARNm du FLC n'était pas détectable, ce qui contraste fortement avec le niveau élevé dans les jeunes tissus de l'apex végétatif. Ceci indique que l'expression du FLC est régulée à la baisse à l'apex après la transition florale.



Figure 2 : Phénotype de floraison de différents individus d'*Arabidopsis thaliana*
(Michaels *et al*, 1999)

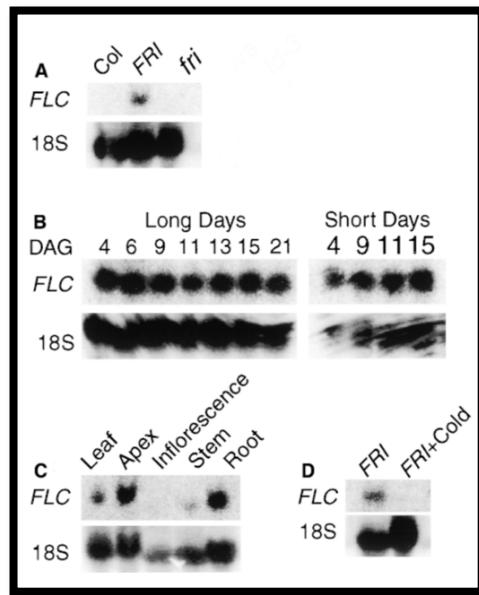


Figure 3 : Expression du gène FLC chez *Arabidopsis thaliana* dans différentes conditions.
(Michaels *et al*, 1999)

- (A) Expression du FLC chez 3 individus *d'Arabidopsis thaliana*
 - o Col : le type sauvage Col
 - o FRI : la descendance contenant FRI-SF2 dans un fond Col
 - o fri : un individu contenant un allèle fri dans Col
- (B) Expression au cours du temps du gène FLC. Le temps est mesuré en jours après la germination (DAG).
- (C) Expression du gène FLC dans divers organes
- (D) Suppression de l'expression du FLC 30 jours après le traitement au froid. Les plantes ont été cultivées pendant 10 jours à 22 °C avant la récolte.

3°) L'effet de la vernalisation sur l'expression de FLC

Nous avons vu précédemment que c'est l'expression du gène FLC qui lui-même est stimulé par l'expression de FRI qui contribue à retarder la floraison chez les écotypes à floraison tardive. Ainsi, les chercheurs ont ensuite voulu savoir si la promotion de floraison par la vernalisation pouvait être permise par une répression de l'expression de FLC. Pour cela, ils ont comparé toujours via Northern Blot, l'expression de FLC chez deux plantes à floraison tardive (possédant les allèles dominant de FLC et FRI), l'une ayant subi la vernalisation et l'autre non (Figure 3D). Les chercheurs ont observé que les plantes non vernalisées possédaient une forte concentration de d'ARNm codés par FLC tandis qu'ils n'en ont pas retrouvé chez la plante exposée au froid. Cette expérience démontre donc que le traitement au froid réprime (de manière directe ou indirecte) l'expression de FLC. Ainsi, le froid contribue à inhiber l'expression du gène FLC qui est un inhibiteur de la floraison, et ceci permet de déclencher précocement la floraison chez les plantes à floraison tardive. Ceci démontre donc l'implication de la modulation du gène FLC dans la réponse à la vernalisation.

Dans cette première partie, nous venons de voir qu'il existe plusieurs écotypes d'*Arabidopsis thaliana*, ayant chacun une floraison plus ou moins retardée et que ceux-ci présentent une sensibilité variable à la vernalisation. Nous avons également vu qu'il s'agit des variations alléliques de FLC et FRI, qui modulent l'arrivée temporelle de la floraison et ce besoin en vernalisation chez ces différents écotypes. En effet, nous avons vu que le gène FRI participe à stimuler l'expression du gène FLC qui contribue à retarder la floraison. Au contraire, l'exposition prolongée au froid contribue à inhiber l'expression de FLC ce qui permet de déclencher la floraison. Ainsi, plus l'expression des gènes FRI et FLC est élevée, plus le passage au froid (la vernalisation) est nécessaire pour réguler à la baisse l'expression de FLC et par conséquent induire la floraison.

Ainsi, les différentes observations que nous venons de mettre en lumière soulèvent plusieurs interrogations. En effet, nous pourrions nous demander comment les conditions prolongées de froid sont perçues par la plante pour induire une répression de l'activité du gène FLC ? Par quel(s) mécanisme(s) la répression du gène FLC est-elle permise ?

Autrement dit, comment la plante fait-elle pour percevoir la période de froid, pour la mémoriser et induire la répression de l'expression de FLC après la période de froid et ainsi permettre la floraison ?

Dans la partie qui suit nous allons tenter d'apporter des éléments de réponse à ces différentes interrogations.

II- Répression de l'activité du gène FLOWERING LOCUS C via l'intervention de différents gènes et acteurs moléculaires

Les chercheurs ont pu identifier de nombreux gènes intervenant dans la répression de l'expression de FLC. Ainsi, nous vous présenterons d'abord la découverte de certains de ces gènes et acteurs moléculaires puis nous vous expliquerons le mécanisme général permettant cette répression de l'expression du gène FLC par le froid.

1°) Découverte des 3 premiers gènes intervenants dans la répression de l'activité du gène FLOWERING LOCUS C

A- Découverte de l'intervention de VERNALIZATION INSENSITIVE3 (VIN3)

Pour identifier les gènes intervenant dans la répression FLC, les chercheurs ont notamment exposé des écotypes d'*Arabidopsis thaliana* à floraison tardive à des agents mutagènes. Puis ils ont regardé s'il y avait l'apparition de nouveaux phénotypes ayant pour caractéristique d'être devenu insensible à la vernalisation. Parmi ces phénotypes mutants, l'un d'eux a été identifié comme possédant une non-expression du gène nommée « VERNALIZATION INSENSITIVE3 » (VIN3) et ayant une réponse à la vernalisation totalement bloquée (Sung *et al*, 2004) (Figures 4 et 5). Les allèles mutés de ce gène sont notés *vin3* (*vin3-1* ; *vin3-2* ; *vin3-3*).

Via analyse par Northern Blot, Sung et Amasino ont étudié l'expression de FLC chez des individus mutés et non mutés pour le gène VIN3 et ayant subi ou non la vernalisation. Ceux-ci ont observés que ce gène est bien réprimé par la vernalisation chez les individus témoins qui possède le gène VIN3 actif alors que chez les mutants *vin3* FLC n'est pas réprimé par la vernalisation (figure 6). De plus, ils ont observé que l'expression de VIN3 était effectivement induite par le froid et que VIN3 n'est exprimé qu'après une certaine durée d'exposition. Ils ont observé que l'expression de VIN3 était proportionnelle à l'inhibition de l'expression du gène FLC et que cette répression du FLC ne se produit pas tant que le VIN3 n'est pas induit. (Figure 7). Sung et Amasino en ont conclu que ce gène participe au processus de distinction de la durée de l'exposition au froid, et permet de s'assurer que la floraison ne se déroule pas avant le début de l'hiver en permettant de distinguer une exposition prolongée au froid des expositions plus courtes pouvant se dérouler à l'automne.

Les chercheurs ont ensuite cloné et séquencé ce gène et ont déterminé qu'il codait pour une protéine qui possédait un signal de localisation nucléaire et un *PHD* (*Plant Homeodomain*) qui est un domaine qui a été retrouvé dans plusieurs complexes de remodelage de la chromatine.

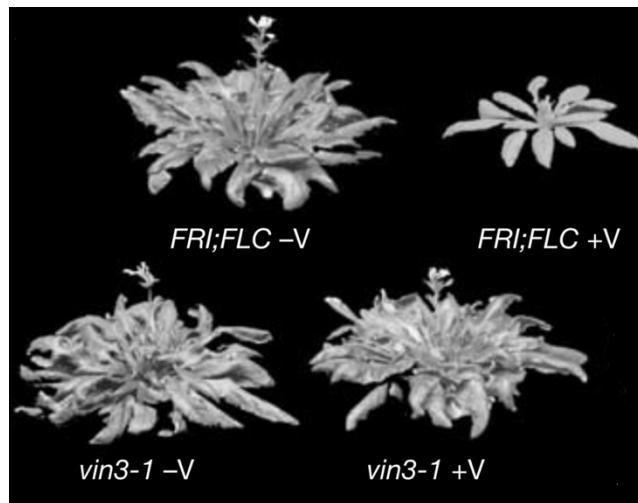


Figure 4: Phénotype de floraison de différents individus d'*Arabidopsis thaliana* mutés et non mutés pour le gène VIN3 et ayant subi ou non la vernalisation
 (Sung *et al*, 2004)

- En haut : la lignée non mutée pour VIN3 (témoin) possède une floraison accélérée lorsqu'elle est exposée à la vernalisation.
- En bas : la lignée ayant un gène VIN3 inactif ne voit pas sa floraison accélérée lorsqu'elle est exposée à la vernalisation

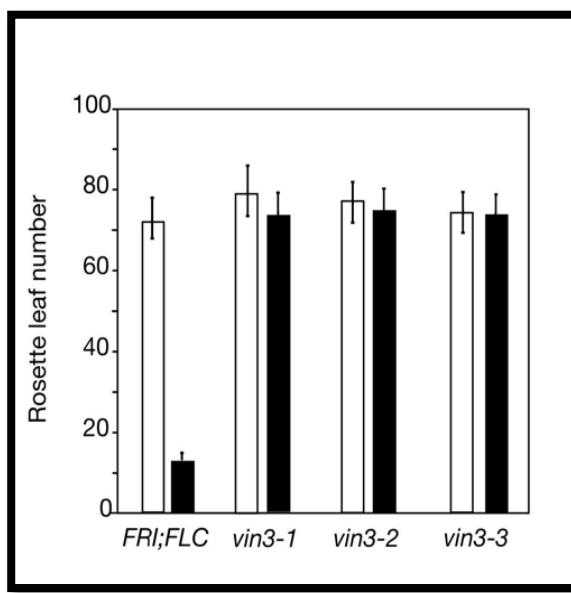


Figure 5 : Temps de floraison des différentes lignées d'*Arabidopsis thaliana* mutés et non mutés pour le gène VIN3 et ayant subi ou non la vernalisation
 (Mesurées en nombre de feuilles apparue avant que les plantes ne fleurissent)
 (Sung *et al*, 2004)

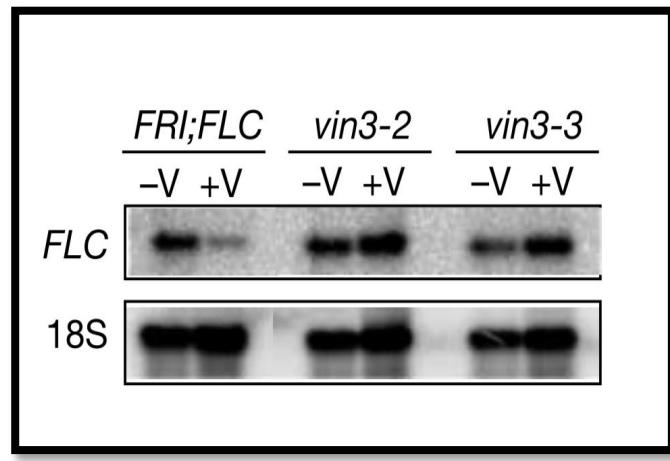


Figure 6: Expression de FLC chez différents phénotypes d'*Arabidopsis thaliana* mutés et non mutés pour le gène VIN3 et ayant subi ou non la vernalisation
 (Sung *et al*, 2004)

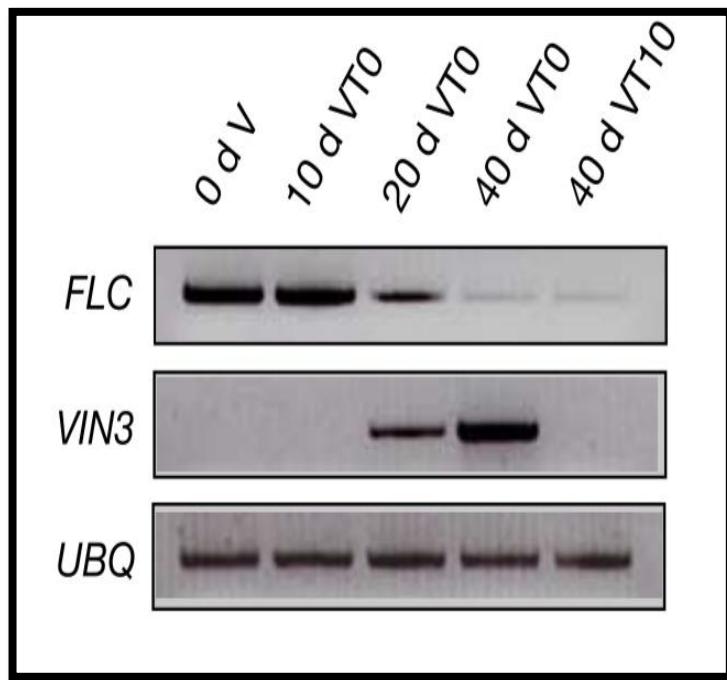


Figure 7: Expression des gènes FLC et VIN3 à différent moment au cours de l'exposition au froid chez un individu d'*Arabidopsis thaliana* à floraison tardive
 (Sung *et al*, 2004)

B- Découverte de l'intervention des gènes VERNALIZATION1 (VRN 1) et VERNALIZATION2 (VRN 2) :

En parallèle de ces recherches sur VIN3, d'autres équipes de scientifiques ont découvert l'existence d'autres gènes intervenant dans les processus d'inhibition de l'expression de FLC après une exposition prolongée au froid (vernalisation). Parmi ces gènes identifiés par analyse mutationnelle il y a notamment les gènes VRN1 et VRN 2 (Gendall *et al*, 2001), (Levy *et al*, 2002), (Sung *et al*, 2004).

Grâce à l'utilisation d'outils bio-informatiques et de comparaison des séquences nucléotidiques et protéiques Levy *et al* ont pu déterminer que le gène VRN1 code pour une protéine de 341 résidus comprenant deux domaines de liaison à l'ADN. Gendall *et al* ont quant à eux découvert que la protéine codée par VRN2 présente une forte homologie avec la protéine codée par le gène SUPPRESSOR OF ZESTE 12 (Su[z]12) que l'on retrouve chez la drosophile. Or il a été démontré que chez cette espèce animale, ce gène Su[z]12 est un membre du complexe du groupe ESC-E(Z) Polycomb, qui est un complexe multiprotéique qui joue un rôle dans le maintien de l'état réprimé de nombreux gènes notamment des gènes HOX de la drosophile. Effectivement, il a été démontré que ce complexe possède une activité méthyltransférase dirigée vers les lysines 9 et 27 de l'histone H3 qui déclenche la liaison de LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 conduisant à la formation d'hétérochromatine et à la réduction au silence de gènes. L'observation de cette homologie entre VRN2 et SU(Z)12 les a conduits à supposer que VRN2, peut réguler la réponse à la vernalisation d'une manière similaire à l'action des protéines codées par Su[z]12 en contribuant au maintien de la répression transcriptionnelle, peut-être par un effet sur la structure de la chromatine au niveau de FLC en induisant des modifications épigénétiques.

Pour confirmer ou non leur hypothèse, les chercheurs (Gendall *et al*, 2001) ont effectué une série d'expériences. Ceux-ci ont d'abord comparé la sensibilité du locus FLC face à la DNase I chez des 2 lots de plantes ayant été soumises à une vernalisation de 4 semaines. Les deux lots possèdent le même fond génétique (*fca-1*) mais le premier lot de plantes possède un gène VNR2 actif et l'autre lot possède la version inactive de ce gène (*vrn2-1*) (Figure 8). Ainsi, ils ont observé que la sensibilité à la DNase I du FLC a été augmentée chez les plantes porteuses de la mutation *vrn2-1*. L'expression du gène VRN2 affecte donc l'accessibilité de la DNase I au niveau du gène FLC. Cette expérimentation suggère que les protéines VRN2 entraînent des changements dans l'organisation de la chromatine au niveau du gène FLC après la vernalisation.

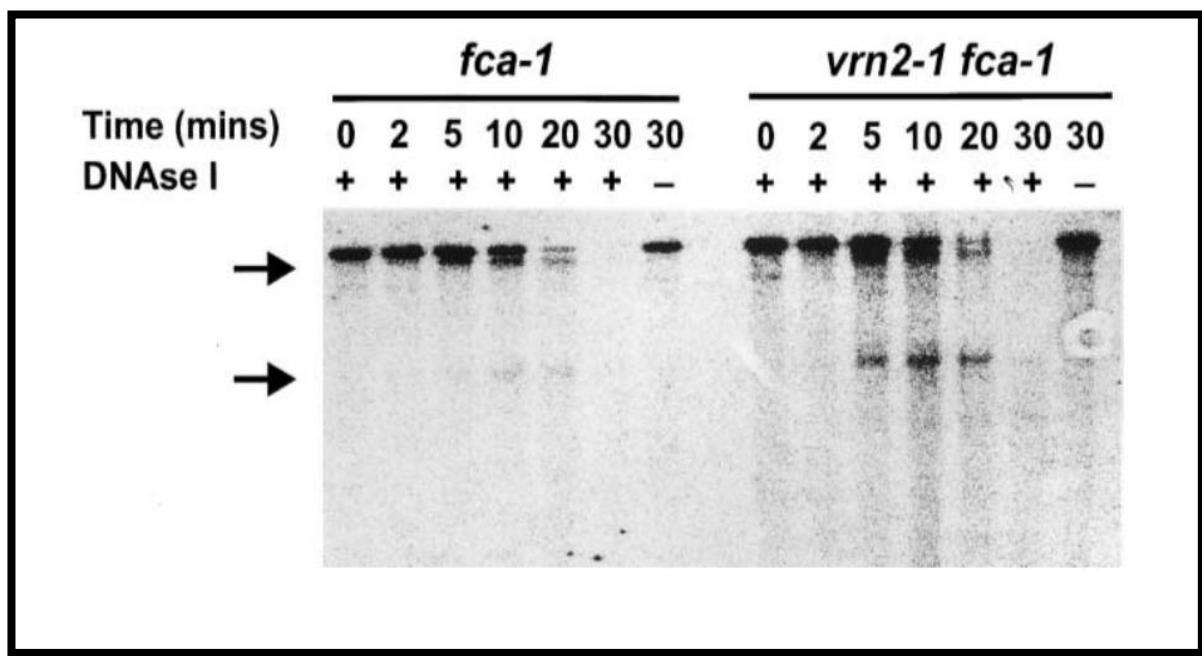
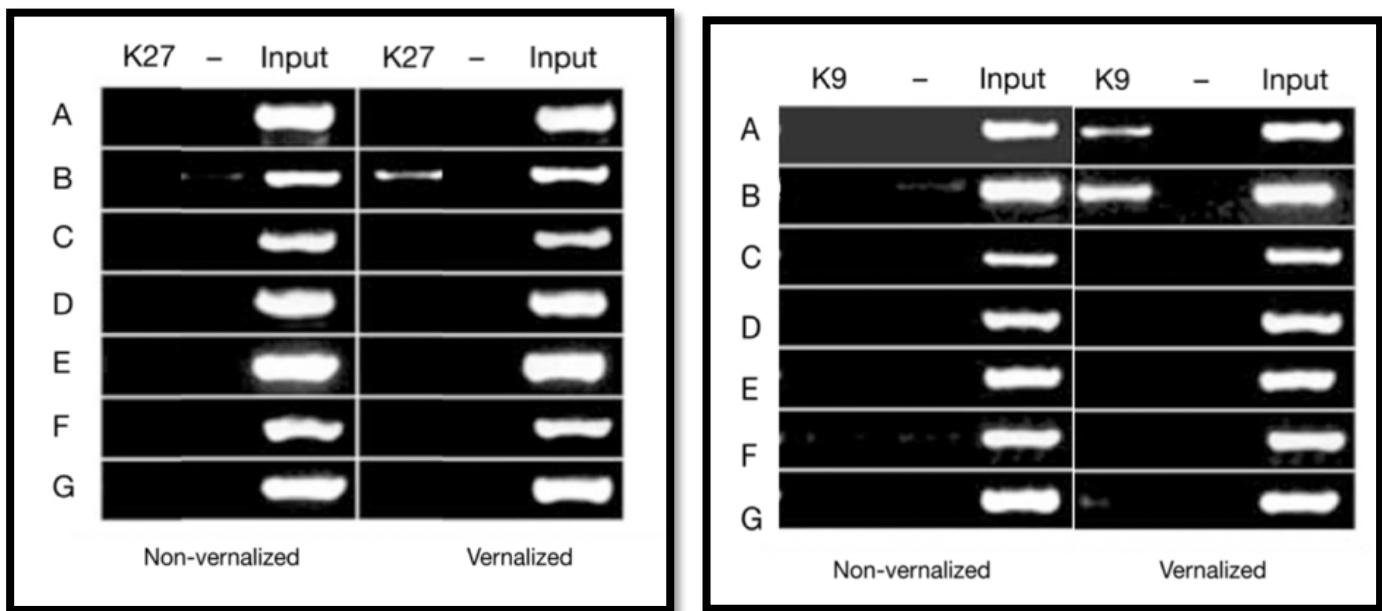
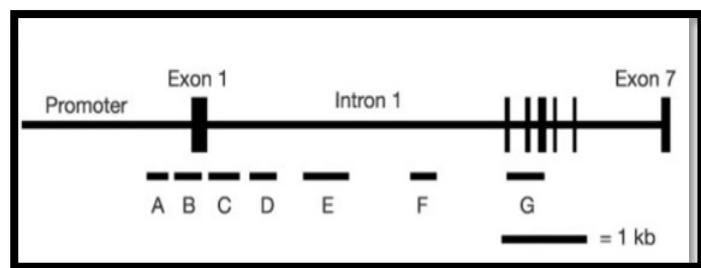


Figure 8 : Sensibilité du locus FLC à la DNase I après la vernalisation chez deux lots d'*Arabidopsis thaliana* dont l'un est muté pour le gène VRN2 et l'autre non
 (Gendall *et al*, 2001)

D'autres chercheurs (Bastow *et al*, 2004) ont ensuite voulu aller plus loin pour comprendre comment les protéines codées par VRN1 et VRN2 agissent sur l'expression de FLC et notamment vérifier si les protéines codées par VRN2 agissent sur la chromatine en induisant les mêmes modifications épigénétiques des histones que chez la drosophile. Les chercheurs ont donc analysé la présence ou non de méthylation de la chromatine à différentes régions du gène FLC (figure 9A) par immunoprécipitation de cette dernière, sans ou avec vernalisation. Dans cette technique, la chromatine est isolée des cellules, soumise à des enzymes de restriction et immunoprécipitée avec une gamme d'anticorps spécifiques à différentes méthylations de différentes lysines de certains histones. Les immunoprécipitations obtenues sont ensuite examinées par PCR. Ceux-ci ont observés la précipitation des régions A et B avec l'anticorps H3 diméthyl K9 et des précipitations au niveau de région B avec l'anticorps H3 diméthyl K27 chez les plantes vernalisées alors que cela n'était pas le cas chez les plantes non soumises à la vernalisation (Figures 9A et 9B). Grâce à cette expérience, les chercheurs en ont conclu que la vernalisation provoque des changements dans la méthylation des histones dans des domaines discrets à l'intérieur du gène FLC, en augmentant la di-méthylation des lysines 9 et 27 sur l'histone H3 (Figure 9).

De plus, par l'analyse de ces méthylations chez différents génotypes après une exposition prolongée au froid (Figure 10), les chercheurs ont observé que les régions A et B sont précipitées par l'anticorps H3 diméthyl K9 chez les semis vernalisés de type sauvage, mais pas chez les mutants vernalisés *vrn1* et *vrn2*. L'anticorps H3 diméthyl K27 précipite la région B après vernalisation chez les semis de type sauvage et *vrn1*, mais pas chez *vrn2* (Figure 10). Ainsi, la diméthylation de H3 K27 dans la région B du gène FLC n'a été perdue que chez les mutants *vrn2*, alors que la diméthylation de H3 K9 dans les régions A et B était absente à la fois chez les mutants *vrn1* et de *vrn2*. Ceci démontre que l'activité des gènes VRN2 et VRN1 est essentiel pour entraîner des modifications épigénétiques au niveau de certaines régions du locus FLC après exposition au froid prolongée.



(B)

(C)

Figure 9 : Modification des méthylations des histones du gène FLC induit par la vernalisation (Bastow *et al*, 2004).

(A) Structure génomique du gène FLC d'*Arabidopsis thaliana* FLC et des régions examinées par immunoprécipitation.

- Les boîtes noires représentent les exons, les lignes représentent le promoteur et les introns. Les régions amplifiées par PCR sont indiquées ci-dessous sous forme de barres étiquetées A à G.

(B) Résultats de l'immunoprécipitation utilisant des anticorps contre H3 diméthyl K27 chez des plantes *fca-1* dans différentes régions du gène FLC

(C) Résultats de l'immunoprécipitation utilisant des anticorps contre H3 diméthyl K9 chez des plantes des plantes *fca-1* dans différentes régions du gène FLC

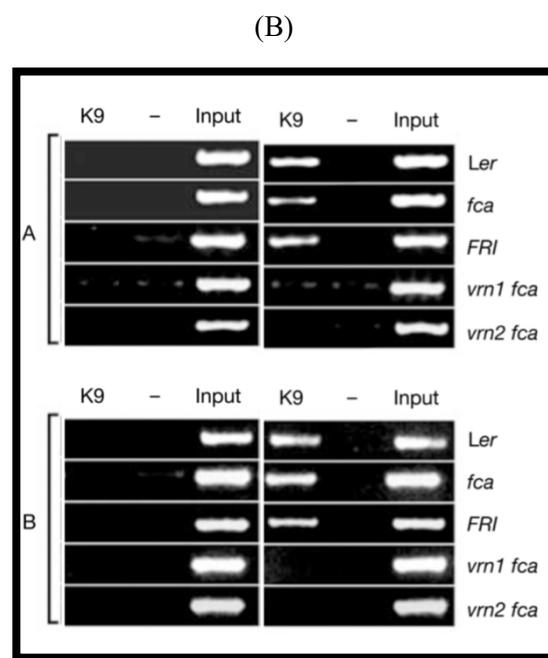
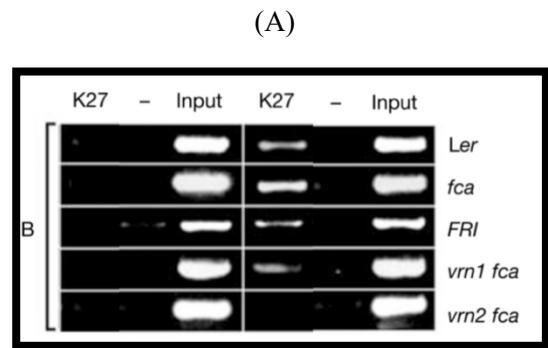


Figure 10 : Modification des méthylations des histones du gène FLC induit ou non par la vernalisation chez différents génotypes d'*Arabidopsis thaliana* (Bastow *et al*, 2004).

(A) Résultats de l'immunoprécipitation utilisant des anticorps contre H3 diméthyl K27 chez différents génotypes de *d'Arabidopsis thaliana* dans la région B du gène FLC

(B) Résultats de l'immunoprécipitation utilisant des anticorps contre H3 diméthyl K9 chez différents génotypes d'*Arabidopsis thaliana* dans les régions A et B du gène FLC

2°) Intervention d'autres acteurs moléculaires

Nous venons de voir que plusieurs gènes dont VIN3, VRN1, VRN2 participent à modifier la structure de la chromatine au niveau du gène FLC en entraînant des modifications épigénétiques tel que des méthylations sur certaines histones de ce locus qui contribue à l'inhibition de l'expression de FLC après vernalisation. Il est intéressant de se demander si les protéines synthétisées par ces gènes interagissent ensemble ? Et s'il y a l'intervention d'autres gènes et acteurs moléculaires ?

A- Polycomb Repressive Complexe 2 (PRC2) et VIL1

Tout d'abord, les chercheurs ont découvert l'existence de nombreux autres gènes codant pour des protéines intervenant dans la régulation de FLC. En effet, nous avons vu précédemment que la protéine codée par VRN2 avait une forte homologie avec celle codée par le gène Su[z]12 qui était un membre du complexe protéine du groupe ESC-E(Z) Polycomb chez la drosophile. C'est à partir de ce constat que les chercheurs ont émis l'hypothèse que VRN2 lui aussi agissait au sein d'un complexe protéique. Cette hypothèse se confirma puisque ces derniers découvrirent que la protéine codée par VRN2 appartenait-elle aussi à un complexe protéique nommé Polycomb Repressive Complexe 2 (PRC2) (Kim *et al*, 2014) (Xu *et al*, 2018). Celui-ci est notamment composé d'une autre protéine codée par un gène nommé CURLY LEAF (CLF). Cette protéine est un orthologue de l'activateur du zeste (E(z)). Dans ce complexe c'est cette protéine qui possède une activité H3K27me3 méthyltransférase.

De plus, un autre gène nommé VERNALIZATION 5 (VRN5) / VIN3-LIKE 1 (VIL1) a été découvert. La protéine codée par ce gène s'associe à VIN3 pour former un hétéromère qui maintient les modifications épigénétiques au niveau des histones qui sont nécessaires pour réduire au silence le gène FLC, (Kim *et al*, 2014) (Xu *et al*, 2018).

B- Intervention des ARN COLDAIR et COOLAIR

Ensuite, deux autres acteurs moléculaires qui sont des ARN non codant se sont montrés essentiels dans la régulation de l'expression de FLC et sont requis afin que certaines plantes deviennent aptes à fleurir après une exposition au froid (Heo *et al*, 2011) (Csorba *et al*, 2014).

L'étude menée par Heo et Sibum a montré qu'un ARN non codant, c'est à dire issu de la transcription de l'ADN mais non traduit en protéine, appelé COLDAIR (Cold Assisted Intronic Non Coding RNA) est nécessaire à la répression de FLC.

A travers une RT-PCR quantitative, ils ont pu connaître la quantité d'ARN non codant lors de la vernalisation. Les chercheurs ont observé un niveau accru de COLDAIR pendant l'exposition au froid avec une expression maximale après 20 jours d'exposition. (Figure 11B). Ceux-ci ont observé que les niveaux de COLDAIR sont revenus au niveau pré-vernalisé lorsque les plantes étaient exposées plus de 30 jours de froid.

L'équipe de chercheurs a ensuite découvert que la transcription de COLDAIR se trouve au sein même du gène FLC. Plus précisément, celle-ci s'effectue dans une région particulière qui est la région VRE qui est située dans le premier intron du gène FLC et cet ARN non codant est transcrit dans le même sens que l'ARNm FLC (Figure 11A). Par ailleurs, d'autres chercheurs avaient précédemment démontré que cette région qui non codante était essentielle pour la régulation du gène FLC. En effet, ils avaient remarqué que la suppression de cette région VRE située dans le premier intron du gène FLC, empêche la répression de l'expression de ce gène FLC qui doit normalement se dérouler après exposition au froid (et cela sans pour autant compromettre la fonction de répresseur floral de FLC). Heo et Sibum ont voulu voir s'il y avait un lien entre l'expression de cet ARN non codant situé dans la région VRE et la régulation à la baisse de FLC après exposition au froid.

Les chercheurs ont d'abord vérifié que le froid prolongé induit une augmentation de l'activité d'un promoteur situé en amont de la partie d'ADN qui code COLDAIR dans la région VRE. Pour cela, ils ont généré des lignées transgéniques qui possèdent une construction génétique avec le gène de la luciférase en aval de 109 paires de bases de la région 5' de VRE, la région qui transcrit COLDAIR a quant à elle été supprimée (Figure 11C). Ceux-ci ont observé une forte expression de la luciférase après 20 jours de traitement à froid dans de multiples lignées transgéniques (Figure 11, C et D), confirmant la présence d'un promoteur qui est responsable de l'augmentation de la transcription de COLDAIR dans la région VRE après une exposition au froid. Ils ont également observé que l'expression de la luciférase est restée élevée tant que les plantes étaient maintenues au froid (Figure 11, C et D). Or nous avons dit précédemment que COLDAIR endogène lui n'a été induit que pendant 10 à 20 jours de froid (Figure 11, B et D) et qu'après 20 jours on retrouve un niveau de transcrits COLDAIR comparable à celui avant la période au bout de 30 jours. Les chercheurs ont tenté de trouver une explication pour cette différence d'expression. Sachant que d'autres chercheurs avaient démontré que la région VRE est essentielle pour inhiber l'expression de FLC après une période de froid, Heo et Sibum ont suggéré que c'est la transcription de l'ARN non codant nommée COLDAIR qui participe de manière plus ou moins direct à la baisse de l'expression du gène FLC après une exposition à un froid prolongé, qui explique notamment sa propre inhibition au bout d'un certain temps.

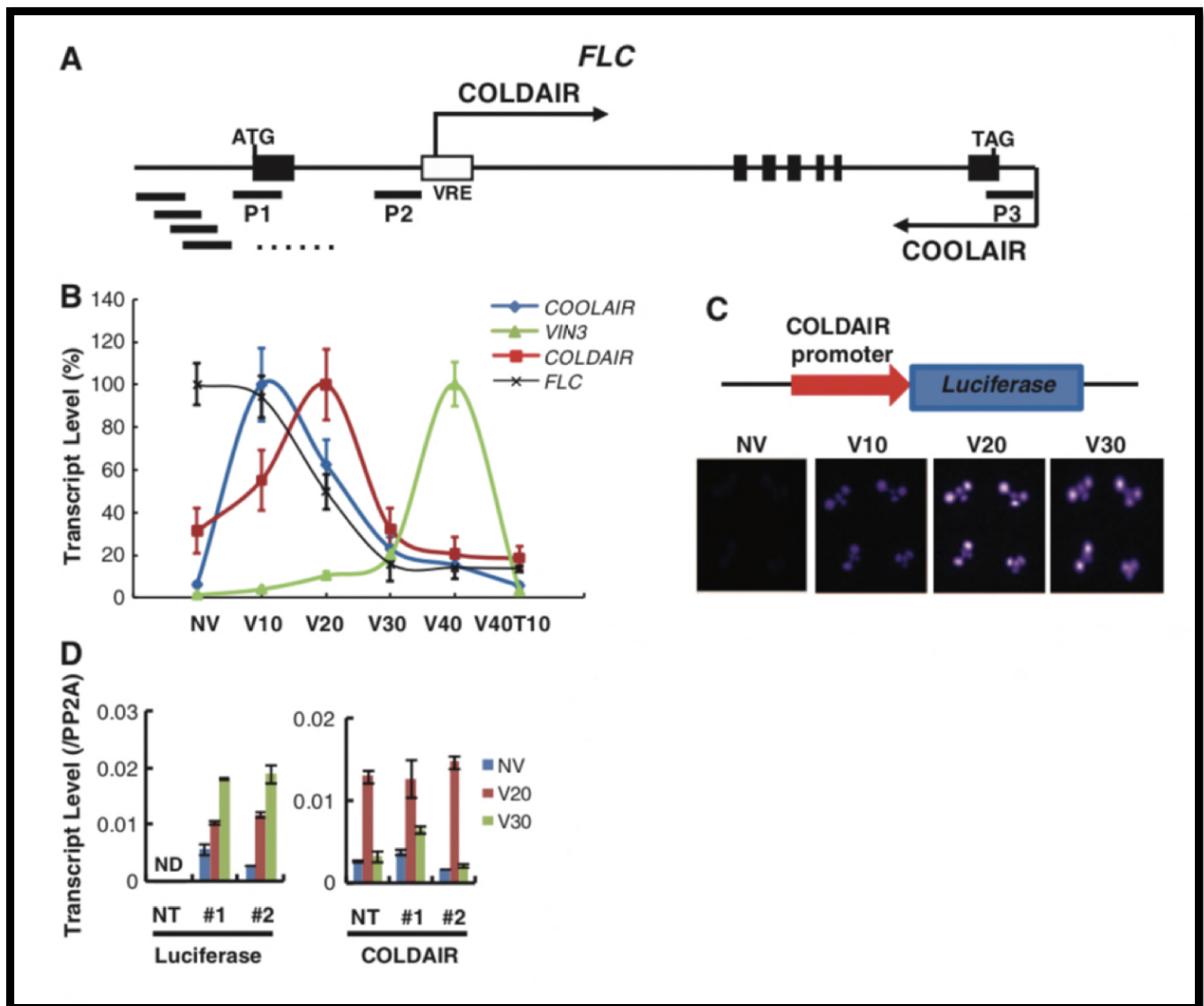


Figure 11 : Etude de l'expression de COLDAIR

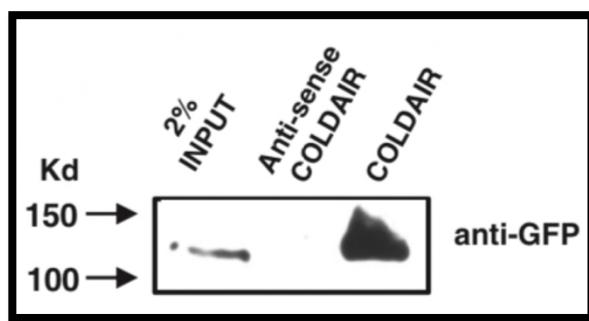
(Heo *et al*, 2011)

- (A) Représentation schématique des sites de début de transcription pour COLDAIR et COOLAIR et la localisation de VRE dans la région génomique FLC.
- (B) Expression de COOLAIR, COLDAIR, VIN3 et FLC au cours de la vernalisation.
- (C) Expression de la luciférase dans les lignées transgéniques promoteur-COLDAIR :: Luciférase au cours de la vernalisation.
- (D) Profils d'expression des transcrits de la luciférase (à gauche) et de COLDAIR (à droite) dans deux lignées transgéniques (« 1 » et « 2 ») et la lignée non transgénique (NT).

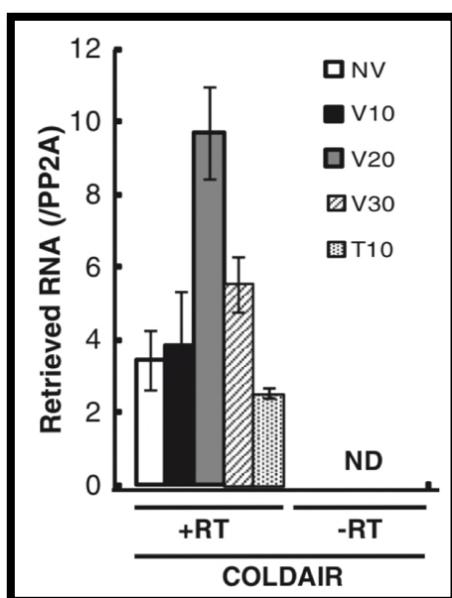
L'équipe de chercheurs a ensuite voulu tester si l'ARN non codant COLDAIR pouvait interagir avec différentes protéines connues comme intervenants dans la régulation de FLC. Ceux-ci ont notamment voulu étudier l'interaction de COLDAIR avec CLF qui est comme nous l'avons vue précédemment un membre du complexe PRC2. Pour traiter la spécificité de l'interaction entre COLDAIR et la protéine CLF native, ceux-ci ont utilisés des extraits nucléaires préparés à partir de lignées transgéniques marquées GFP::CLF où GFP est une protéine fluorescente verte pour effectuer un test de liaison à l'ARN. Ceux-ci ont alors détecté une association de CLF avec le brin sens de COLDAIR (Figure 12 A) et non avec le brin antisens de COLDAIR, confirmant l'interaction spécifique de COLDAIR avec la PRC2 native.

Après cette première analyse d'interaction, ceux-ci ont voulu voir si l'association spécifique de COLDAIR avec PRC2 mais cette fois-ci en conditions réelles, c'est-à-dire *in vivo* au cours de la vernalisation (Figure 12 B). Ils ont observé que l'association la plus forte de COLDAIR avec le CLF lorsque l'expression de COLDAIR était maximale à 20 jours de froid. Pour rappel, cette méthode concordait avec le moment où COLDAIR était le plus transcrit.

Pour confirmer le rôle de COLDAIR dans la régulation de FLC et donc dans la vernalisation, les chercheurs ont décidé d'effectuer une autre expérience. Heo et Sibum ont choisi comparer l'expression de FLC et le phénotype de floraison, chez une lignée normale et chez deux lignées (34-1, 36-2) dont la partie responsable de la transcription de COLDAIR a été muté et ne peut pas synthétiser correctement COLDAIR. À travers cette étude, il a été constaté que les niveaux de COLDAIR ont été considérablement réduit au cours de la vernalisation par rapport à ceux de la lignée parentale. Les lignées parentales ont montré une floraison accélérée, tandis que les lignées mutées pour COLDAIR ont montré une floraison tardive après le traitement de vernalisation (Figure 13, A et B). Les réponses réduites à la vernalisation observées dans les lignées mutées pour COLDAIR sont compatibles avec les niveaux d'expression du FLC au cours de la vernalisation (Figure 13C). Pendant l'exposition au froid, la répression du FLC a encore été observée dans les lignées mutées (Figure 13C). Cependant, ils ont constaté qu'après que les plantes ont été ramenées à une température de croissance chaude, la répression du FLC n'a été maintenue que pour les lignées parentales (Figure 13C), ce qui indique que COLDAIR permet de jouer un rôle dans le maintien d'un état réduit au silence et stable de FLC après la période de froid.



(A)



(B)

(A) L'ARN COLDAIR in vitro se lie à CLF du PRC2 obtenue à partir d'extraits nucléaires.

(B) L'immunoprécipitation CLF se lie à l'ARN COLDAIR au cours de la vernalisation.

-Les données de la PCR quantitative sont relatives au niveau de fond des précipitations d'ARN (PP2A).

-+RT, avec transcription inverse des précipités

--RT, sans transcription inverse des précipités (contrôle)

-T10 : 30 jours de traitement de vernalisation suivis de 10 jours de température de croissance normale.

Figure 12 : COLDAIR s'associe à PRC2 pendant l'exposition au froid

(Heo *et al*, 2011)

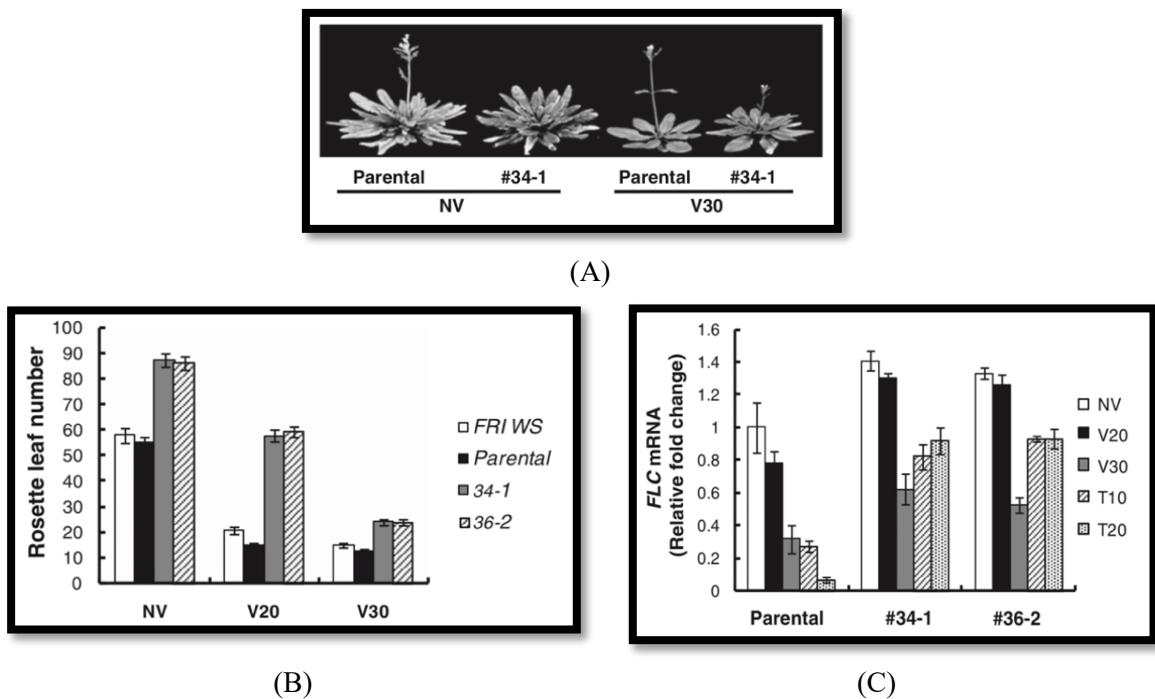


Figure 13 : COLDAIR est nécessaire pour une répression correcte du FLC au cours de la vernalisation
 (Heo *et al*, 2011)

- (A) Comportements de floraison de la ligne parentale et d'un mutant (#34-1) pour COLDAIR
- (B) Les périodes de floraison sont déterminées par le nombre de feuilles au moment de la floraison pour la lignée FRI WS, pour la lignée parentale et pour deux lignées mutées pour COLDAIR (34-1, 36-2).
- (C) Changements de l'ARNm FLC au cours de la vernalisation de la lignée parentale et de deux lignées mutées pour COLDAIR.
- Les données sont relatifs au taux d'ARNm FLC dans la lignée parentale avant la vernalisation.
 - T20 : correspond à 30 jours de traitement de vernalisation suivis de 20 jours de croissance à température normale.

Enfin, les chercheurs ont voulu analyser l'impact de cet ARN non codant sur les modifications au niveau de la chromatine du gène FLC. Heo et Sibum se sont d'abord intéressés au niveau d'occupation de CLF au niveau du gène FLC. Ceux-ci ont notamment constaté que chez les lignées dont COLDAIR est fonctionnel, il y a déjà un niveau basal d'occupation de la CLF au niveau du gène FLC avant même la vernalisation et que ce niveau d'occupation augmente après la vernalisation. (Figure 14, B). Au contraire, ils ont observé que les lignées mutées pour COLDAIR, possède un niveau basal d'occupation du CLF à la chromatine FLC plus faible avant la vernalisation que chez les lignées non mutées pour COLDAIR, et que l'enrichissement accru du CLF par vernalisation n'a pas été observé dans les lignées où COLDAIR était muté (Figure 14B). Sachant que CLF appartient au complexe PCR2 qui intervient notamment dans la triméthylation des lysines 9 et 27 sur l'histone H3 du gène FLC, et participe à la répression de FLC, les chercheurs se sont attardés à mesurer les concentrations de H3K27me3. Or ils ont constaté que ce nombre de méthylation a effectivement augmenté au niveau de la chromatine du gène FLC à la suite de la vernalisation chez les lignées non mutées pour COLDAIR alors que cet enrichissement en H3K27me3 médié par le froid a été largement altéré chez les lignées mutées (Figure 14C).

Ainsi, ces expériences démontrent que l'ARN non codant nommée COLDAIR peut s'associer avec CLF qui est un membre du complexe PCR2. Plus précisément, COLDAIR est nécessaire pour le recrutement de PCR2 au niveau de la chromatine du gène FLC. Au niveau de ce gène, ces deux éléments interagissent avec la chromatine en modifiant sa structure contribuant ainsi à stabiliser celle-ci sous une forme empêchant l'expression de FLC après une exposition au froid.

Un autre ARN non codant nommé cette fois-ci COOLAIR s'est également montré comme intervenant dans la régulation de FLC (Csorba *et al*, 2014). Cette ARN non codant est lui-aussi synthétisée à partir du d'un intron du gène FLC mais contrairement à COLDAIR celui-ci est transcrit dans le sens inverse de l'ARN FLC (Figure 11A) et son maximum d'expression s'effectue seulement après 10 jours d'exposition au froid (Figure 11B). Il a été démontré que COOLAIR est physiquement associé au locus FLC mais pas au complexe PCR2. De plus, ceux-ci ont démontré que cet ARN non codant accélère l'arrêt transcriptionnel de FLC pendant l'exposition à froid et que l'élimination de COOLAIR a perturbé le remplacement synchronisé de la méthylation du H3K36 par le H3K27me3 au site de nucléation du FLC intragénique pendant le froid. Ainsi, contrairement à COLDAIR, les chercheurs ont remarqué que COOLAIR et PCR2 fonctionnent indépendamment dans le silence de FLC après exposition au froid.

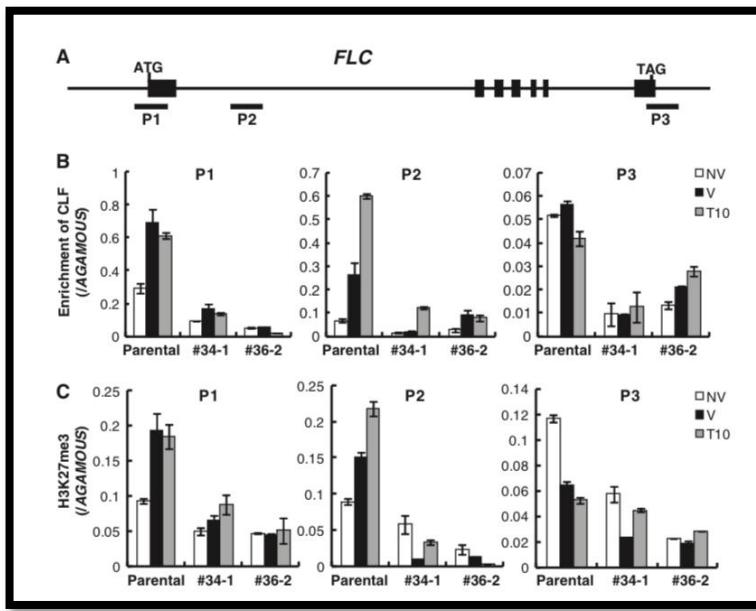


Figure 14 : Changements dynamiques au niveau de la chromatine du gène FLC au cours de la vernalisation.
(Heo *et al*, 2011)

(A) Représentation schématique de la région génomique FLC.

-Les positions relatives des ensembles d'amorces utilisés pour les différents tests d'immunoprecipitation sont indiquées (P1 à P3).

(B) Changements dans l'occupation de CLF au niveau de la chromatine du gène FLC au cours de la vernalisation.

- Les données sont relatives à l'occupation de CLF au niveau de la chromatine du gène AGAMOUS

(C) Changements dans l'enrichissement de H3K27me3 au niveau de la chromatine du gène FLC au cours de la vernalisation.

- Les données sont relatives au niveau d'enrichissement en H3K27me3 à la chromatine AGAMOUS

3°) Mécanisme général de l'inhibition de l'expression de FLC par la vernalisation

Maintenant que nous avons une vue d'ensemble des principaux acteurs moléculaires intervenants dans la répression de FLC lors de l'exposition au froid, nous allons pouvoir faire la synthèse du mécanisme général de cette répression. Pour cela, nous allons décrire un schéma bilan (Figure 15) de cette régulation simplifiée (Kim *et al*, 2014).

Tout d'abord, avant l'exposition au froid (automne), le FLC est fortement exprimé. Ceci est permis par l'intervention de différents complexes de remodelage de la chromatine dont nous n'avons pas parlé pour le moment qui sont PAF1-C, COMPASS-C et RAD6-BRE1-C. Ces différents acteurs maintiennent cette conformation active de la chromatine en induisant diverses modifications épigénétiques. Le complexe PAF induit notamment des méthylations des lysine 4 et 36 au niveau des queues d'histone 3 (H3K4triMe et H3K36triMe).

Ensuite, l'exposition prolongée au froid (hiver), entraîne l'induction du gène VIN3 ainsi que la transcription à partir du gène FLC, de long ARN non codants nommés COOLAIR et COLDAIR. Les COLDAIR vont permettre le recrutement au niveau du gène FLC d'un complexe protéique nommé PRC2 (composé notamment des protéines VRN2 et CLF). VIN3 et VIL1/VRN5 vont alors s'associer à ce complexe PRC2 et à la chromatine du gène FLC. Ces différents permettent alors d'entraîner un ensemble de nouvelles modifications épigénétiques au niveau des histones de la chromatine de FLC. Ces différents acteurs vont notamment entraîner des modifications répressives de la chromatine telles que la méthylation des lysines 9 et 27 de l'histone 3, qui participent à l'inhibition de ce gène. Ces modifications épigénétiques se propagent alors sur l'ensemble du gène FLC.

Enfin, après la période de froid (printemps), l'état réprimé du FLC est maintenu de manière stable grâce aux activités combinatoires des complexes de type PRC2 et PRC1 et d'autres acteurs tel que VRN1. Cette répression induite par des modifications épigénétiques, présente dans tous les tissus, est stable au travers des divisions mitotiques mais une haute activité de FLC est restaurée à chaque nouvelle génération, après passage par le stade de la méiose.

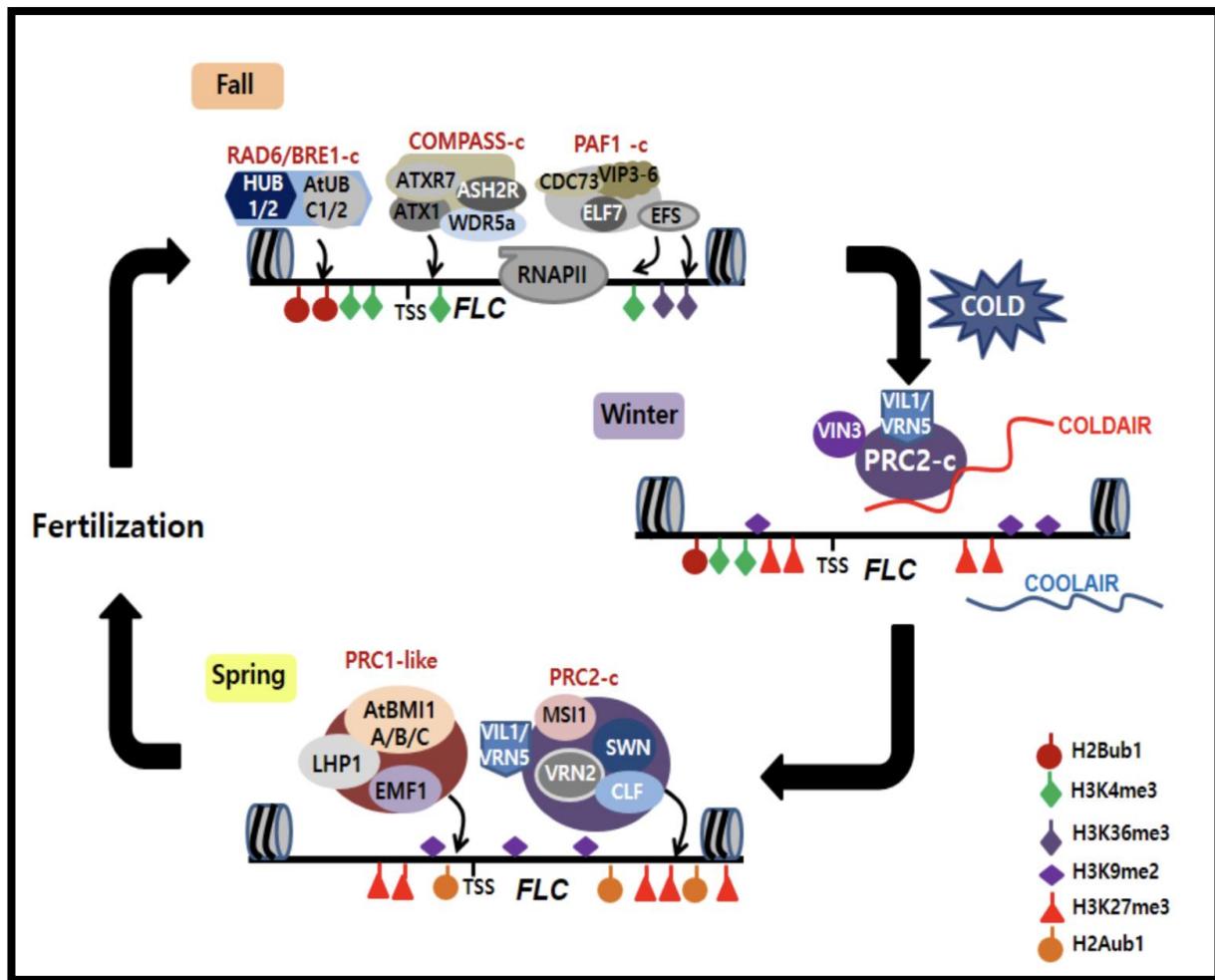


Figure 15 : Représentation schématique des mécanismes permettant l'activation et à la répression du gène *FLC*.
 (Kim *et al*, 2014).

Conclusion

Dans ce TER nous avons cherché à comprendre quels sont les mécanismes physiologiques et moléculaires responsables de la vernalisation chez la plante modèle : *Arabidopsis thaliana*.

Nous venons de voir que la vernalisation est un mécanisme qui entraîne l'acquisition ou l'accélération de la capacité de floraison par une exposition prolongée à des conditions froides. De nombreux gènes et acteurs moléculaires sont impliqués dans la régulation de la floraison par la vernalisation chez l'arabette des dames.

Dans un premier temps, nous avons découvert l'implication de deux premiers gènes dans ce processus chez cette plante. Ceux-ci sont FLOWERING LOCUS C (FLC) et FRIGIDA (FRI). Nous avons vu que ces deux gènes interagissent en synergie pour retarder la floraison, et qu'une perte de fonction dans l'un ou l'autre gène entraîne l'élimination du phénotype de floraison tardive. Plus précisément, nous avons observés le gène FRI participe à stimuler l'expression du gène FLC qui contribue à retarder la floraison. De plus, nous avons vu que c'est FLC qui possède un rôle central dans la régulation de floraison lors d'un traitement au froid. En effet, nous avons observés que l'exposition prolongée au froid contribue à inhiber l'expression de FLC ce qui permet de déclencher la floraison.

Dans un second temps, nous nous sommes alors attardés à comprendre par quel type de mécanisme l'expression de ce gène FLC pouvait être régulé à la baisse lors de la vernalisation. Nous avons découvert que ce contrôle fait intervenir de nombreux autres gènes et acteurs moléculaires et qui conduisent à la répression de FLC par une mécanisme épigénétique. Effectivement, nous avons vu que l'exposition prolongée au froid entraîne l'induction du gène VIN3 ainsi que la transcription à partir du gène FLC, de long ARN non codants nommés COOLAIR et COLDAIR. Ce deuxième groupe d'ARN non codant vont permettre le recrutement au niveau du gène FLC d'un complexe protéique nommé PRC2 (composé notamment des protéines VRN2 et CLF). VIN3 et VIL1/VRN5 vont alors s'associer à ce complexe PRC2 et à la chromatine du gène FLC. Ces différents acteurs vont notamment entraîner des modifications au niveau de la chromatine telle que la méthylation des lysines 9 et 27 de l'histone 3 qui participent à l'inhibition de ce gène après vernalisation. Nous avons également appris que cette régulation de l'expression de FLC est maintenue même après le retour meilleure condition. Ceci s'explique par l'extension et le maintien des modifications épigénétiques au niveau des histones du gène FLC.

Ainsi, ici nous avons étudié la voie de régulation de la vernalisation via FLC chez *Arabidopsis thaliana*. Or, bien que la majeure partie de la promotion de la floraison par vernalisation soit due à la répression de FLC. Il existe en réalité d'autres mécanismes parallèles à cette voie qui permettent la vernalisation indépendamment de la régulation via FLC. Pour finir, nous nous sommes focalisés sur la vernalisation chez *Arabidopsis thaliana*, or de nombreuses autres plantes effectuées tel que le blé d'hiver ou la carotte nécessite ce mécanisme pour devenir apte à fleurir, il serait donc intéressant de comparer les similitudes et différences des voies et mécanismes qui permettent le déclenchement de la floraison après une exposition au froid chez ces différentes espèces.

Références bibliographiques

Bastow R., Mylne J. S., Lister C., Lippman Z., Martienssen R. A. & Dean C. (2004) *Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation*. *Nature*, [427\(6970\), 164-167.](#)

Csorba T., Questa J. I., Sun Q. & Dean C. (2014) *Antisense COOLAIR mediates the coordinated switching of chromatin states at FLC during vernalization*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [111\(45\), 16160-16165.](#)

Gendall A. R., Levy Y. Y., Wilson A. & Dean C. (2001) *The VERNALIZATION 2 Gene Mediates the Epigenetic Regulation of Vernalization in Arabidopsis*. *Cell*, [107\(4\), 525-535.](#)

Heo J. B. & Sung S. (2011) *Vernalization-Mediated Epigenetic Silencing by a Long Intronic Noncoding RNA*. *Science*, [331\(6013\), 76-79.](#)

Kim D.-H. & Sung S. (2014) *Genetic and Epigenetic Mechanisms Underlying Vernalization*. *The Arabidopsis Book*, [12, e0171.](#)

Levy Y. Y., Mesnage S., Mylne J. S., Gendall A. R., & Dean C. (2002) *Multiple Roles of Arabidopsis VRN1 in Vernalization and Flowering Time Control*. *Science*, [297\(5579\), 243-246.](#)

Michaels S. D. & Amasino R. M. (1999) *FLOWERING LOCUS C Encodes a Novel MADS Domain Protein That Acts as a Repressor of Flowering*. *The Plant Cell*, [11\(5\), 949-956.](#)

Sung S. & Amasino R. M. (2004) *Vernalization in Arabidopsis thaliana is mediated by the PHD finger protein VIN3*. *Nature*, [427\(6970\), 159-164.](#)

Xu S. & Chong K. (2018). *Remembering winter through vernalisation*. *Nature Plants*, [4\(12\), 997-1009.](#)

Résumé

La vernalisation est un mécanisme qui entraîne l'acquisition ou l'accélération de la capacité de floraison par une exposition prolongée à des conditions froides. Chez *Arabidopsis thaliana*, les gènes FLOWERING LOCUS C (FLC) et FRIGIDA (FRI) sont deux gènes qui interagissent en synergie pour retarder la floraison, une perte de fonction dans l'un ou l'autre gène entraîne l'élimination du phénotype de floraison tardive. Plus précisément, le gène FRI participe à stimuler l'expression du gène FLC qui contribue à retarder la floraison. De plus, FLC possède un rôle central dans la régulation de la floraison médié par la vernalisation. En effet, l'exposition prolongée au froid contribue à inhiber l'expression de FLC via un mécanisme épigénétique ce qui permet de déclencher la floraison. Ce contrôle fait intervenir de nombreux gènes et acteurs moléculaires. Effectivement, l'exposition prolongée au froid entraîne l'induction du gène VIN3 ainsi que la transcription à partir du gène FLC, de long ARN non codants nommés COOLAIR et COLDAIR. Ce deuxième groupe d'ARN non codant vont permettre le recrutement au niveau du gène FLC d'un complexe protéique nommé PRC2 (composé notamment des protéines VRN2 et CLF). VIN3 et VIL1/VRN5 vont alors s'associer à PRC2 et à la chromatine du gène FLC. Ces différents acteurs vont notamment entraîner des modifications au niveau de la chromatine telle que la méthylation des lysines 9 et 27 des histones 3 qui participent à l'inhibition de ce gène.

Mots clefs: Vernalisation, *Arabidopsis thaliana*, FLC, régulation, floraison

Abstract

Vernalization is a mechanism that results in the acquisition or acceleration of flowering ability by prolonged exposure to cold conditions. In *Arabidopsis thaliana*, the FLOWERING LOCUS C (FLC) and FRIGIDA (FRI) are two genes that interact to delay flowering, a loss of function in either gene results in the elimination of the late flowering phenotype. FRI gene is involved in stimulating the expression of the FLC gene that contributes to delayed flowering. Furthermore, FLC has a central role in vernalization-mediated regulation of flowering. Indeed, prolonged exposure to cold contributes to inhibit the expression of FLC through an epigenetic mechanism which allows to trigger flowering. This control involves many genes and molecular actors. Prolonged exposure to cold results in the induction of the VIN3 gene as well as the transcription from the FLC gene of long non-coding RNAs named COOLAIR and COLDAIR. This second group of non-coding RNAs will allow the recruitment of a protein complex called PRC2 (composed of VRN2 and CLF proteins) to the FLC gene. VIN3 and VIL1/VRN5 will then associate with PRC2 and the chromatin of the FLC gene. These different actors will notably lead to modifications in chromatin such as the methylation of lysines 9 and 27 of histones 3 which participate in the inhibition of this gene.

Key words: Vernalization, *Arabidopsis thaliana*, FLC, regulation, flowering