



**HAL**  
open science

**Contrôle épigénétique du risque de montaison chez une  
plante de grande culture : la betterave sucrière : mise au  
point d'une stratégie de caractérisation d'épi-allèles  
associés à la sensibilité à la montaison en vue de  
l'élaboration d'un test de sélection**

Marie-Véronique Gentil

► **To cite this version:**

Marie-Véronique Gentil. Contrôle épigénétique du risque de montaison chez une plante de grande culture : la betterave sucrière : mise au point d'une stratégie de caractérisation d'épi-allèles associés à la sensibilité à la montaison en vue de l'élaboration d'un test de sélection. Sciences agricoles. Université d'Orléans, 2009. Français. NNT : 2009ORLE2005 . tel-00586268

**HAL Id: tel-00586268**

**<https://theses.hal.science/tel-00586268>**

Submitted on 15 Apr 2011

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES EA 1207

- INRA, USC2030 Arbres et Réponses aux Contraintes Hydrique et Environnementales

# THÈSE

présentée par :

**Marie-Véronique GENTIL**

Soutenue le : 27 Janvier 2009

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : **Physiologie et biologie des organismes et des populations**

**Contrôle épigénétique du risque de montaison chez une  
plante de grande culture : la betterave sucrière.**

**Mise au point d'une stratégie de caractérisation  
d'épi-allèles associés à la sensibilité à la montaison en vue de  
l'élaboration d'un test de sélection.**

THÈSE dirigée par :

**Daniel HAGÈGE**  
**Stéphane MAURY**

Professeur, Université d'Orléans  
Maître de Conférences HDR, Université d'Orléans

RAPPORTEURS :

**Françoise CORBINEAU**  
**Alain RIVAL**

Professeur, Université Pierre et Marie Curie, Paris  
Chercheur HDR, CIRAD, Montpellier

JURY :

**Denis TAGU**  
**Steve BARNES**  
**Franck BRIGNOLAS**  
**Françoise CORBINEAU**  
**Daniel HAGÈGE**  
**Claude JOSEPH**  
**Stéphane MAURY**  
**Alain RIVAL**

Directeur de recherche, INRA, Rennes – Président du jury  
Docteur, Manager scientifique, Entreprise SES-VanderHave, Tienen, Belgique  
Professeur, Université d'Orléans  
Professeur, Université Pierre et Marie Curie, Paris  
Professeur, Université d'Orléans  
Maître de Conférences HDR, Université d'Orléans  
Maître de Conférences HDR, Université d'Orléans  
Chercheur HDR, CIRAD, Montpellier





Watson & Crick

Tiens, on dirait un  
groupement méthyle  
sur cette cytosine !

Là où tout a commencé...



*à mon père*  
*à mon oncle Paul*



# Remerciements

---

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté de lire et de juger cette thèse :

- Merci à Françoise Corbineau et Alain Rival d'avoir accepté la "lourde" tâche de rapporteurs.
- Merci à Steve Barnes, Franck Brignolas, Claude Joseph et Denis Tagu pour avoir accepté d'être examinateurs.

Je tiens également à remercier le conseil régional de la région Centre et l'entreprise SESVanderHave pour avoir financé ce projet. Je tiens particulièrement à remercier Marc Lefebvre et de nouveau Steve Barnes pour leur accueil sans faille et leur enthousiasme pour l'ensemble de nos résultats. J'espère Steve, que tu ne trouveras pas que ce travail ressemble à une "stamps collection".

Je remercie Francis Delmotte pour m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures.

Je tiens à remercier Daniel Hagège pour m'avoir proposé ce sujet et pour toute la confiance qu'il m'a accordée dans ce projet.

J'aimerais exprimer ma plus sincère reconnaissance envers Stéphane Maury. Tout d'abord pour m'avoir accepté en tant que stagiaire dès le master 2 et cela malgré mon passé de "prépa-capessienne", puis pour m'avoir permis de poursuivre en thèse et d'entrer dans le monde de la biologie moléculaire et surtout de l'épigénétique. J'ai beaucoup apprécié tes qualités professionnelles et humaines (humour caustique et bons conseils)... Merci pour tout.

Je tiens aussi à remercier Claude Joseph pour tous ses précieux conseils et le temps qu'il a consacré à relire tous mes projets d'articles et mes différentes versions du manuscrit. Nos petits cafés vont me manquer.

Je remercie Franck Brignolas pour sa séance de stats et pour m'avoir laissé le remplacer lors des TP d'anatomie végétale qui resteront des souvenirs inoubliables (surtout pour mes étudiants).

Je souhaite aussi remercier Alain Delaunay pour ses encouragements, son aide irremplaçable jusqu'à ma période de "nervous breakdown" au moment de finaliser et d'imprimer le manuscrit. Nos discussions au laboratoire me manqueront, ainsi que tes sifflements mélodieux dans les couloirs.

J'aimerais remercier : Françoise Chedor ma collègue du bout du labo avec qui je me sentais moins seule, Sabine Carpin pour ses paroles réconfortantes et sa bonne humeur. Je remercie également François Héricourt pour ses conseils et pour m'avoir prêté son exemplaire de thèse à un moment crucial. Je tiens également à remercier Gilles Moreau pour avoir toujours été disponible pour moi lors de mes nombreux problèmes informatiques (à bas les ordinateurs administrés!). J'adresse mes remerciements à l'ensemble des membres du LBLGC : Christiane Depierreux, Aurélien Sallé, Cécile Barbaroux, Dominico Morabito, Stéphanie Bankhead, Laurent Jean-Alphonse, François Lieutier, Valérie Altemayer, Jean-Claude Vala, Daniel Auguin...

J'ai également une pensée reconnaissante envers Isabelle Fauchier pour son humour et son aide lors de mes nombreuses commandes.

Je tiens aussi à remercier Simonne Bossard sans qui mon cursus universitaire n'aurait pas été le même, Isabelle Lejan pour sa disponibilité et son aide lors des TP d'anatomie, Xavier Pineau pour sa compagnie lors de nos repas au RU et surtout sa "diligence" à engouffrer ses repas, source intarissable de discussion, Carine Martin pour sa gentillesse et Estelle Boulmier.



Bien sûr je tiens particulièrement à remercier les nombreux thésards et stagiaires que j'ai côtoyé au sein du LBLGC:

Je souhaite remercier les "Yougos" : Adisa, Sonja et Dubravko qui m'ont accueillie lors de mon arrivée au laboratoire.

Je tiens à remercier Delphine Gourcilleau pour avoir réussi à me supporter plus d'une année dans le même bureau. La journée de manip "test enzymatique" restera également gravée dans ma mémoire.

Je tiens également à remercier mes deux anciens stagiaires devenus grands : Carole et Clément, qui ont participé à rendre cette troisième année thèse et notamment la mise au point de la PCR au bisulfite inoubliable ! Merci à vous deux, et à Claire pour votre aide et votre soutien lors de la rédaction de mon manuscrit. Claire je te laisse mon bébé, bon courage à toi pour la suite.

J'aimerais remercier mes "girl friends" : Agnès pour ses bons conseils, Fotini pour avoir été un modèle de persévérance et pour son accueil en Grèce à un moment clé de ma thèse, Coralie avec qui tous les bons moments et les longues discussions "remontage de moral" vont me manquer et Sophie. Merci également à Romain, Bruno pour son humour, Ludo (pour ses cigarettes de la dernière chance), Thomas, Sylvain (tic) et Régis (tac) pour votre gentillesse.

Je n'oublie pas de remercier mes géologues (et physiciens) préférés pour les soirées auxquelles vous m'avez invitées même si j'étais toujours fatiguée et souvent débordée : Jérémy & Marina, Paulo & Joséphine, Jérôme, Juju (Caliméro), Yanouche, Charles & Flo (les Rennais), Romain "Coch" & Caro, Johann & Nat, Mat, Prisc', Oman, Bibou & Angélique, Fred & Lulu, Pablo ...et tous ceux que j'oublie

Merci également aux personnes de l'INRA d'Orléans: Jean-Paul Charpentier et Nathalie Noel-Boizot pour leur gentillesse et leur disponibilité lors de mes longues journées "radioactivité". Merci à Marie-Claude Lesage-Descauses, Emmanuelle Magnoux pour leurs conseils et leurs séquençages irréprochables.

Merci aux personnes du Laboratoire de Neurobiologie : Céline, Olivier, Marie-Yvonne ; et notamment les (anciens) thésards et post-doc : Yohan, Mélanie, Guilhem, Matthieu et Hélène (merci encore pour le super thermocycleur).

Pour finir et bien que cela semble évident, je remercie ma famille :

Jean-marie pour avoir été un oncle discret mais toujours là en cas de besoin; Mairaine pour m'avoir hébergée toutes ses années ce qui m'a permis de progressivement grimper les échelons universitaires; ma chère tante "Red Delicious" pour son soutien, Juju & dils (et bienvenue à la petite Clara), Ralph, Céline & leur petit Maël, ma cousine préférée Cloé, Pierre et Jacqueline.

Merci aux Trap qui m'ont accepté dans leur famille et pour leur soutien sans faille : Mémé, Jacqueline, Bernard, Jean, Diane & François.

Enfin, je tiens à remercier les deux Pierre de ma vie:

Tout d'abord mon père, pour m'avoir toujours aimée, soutenue et pour m'avoir portée le plus haut possible.

Mon époux, ma moitié pour m'avoir encouragé à embrasser la carrière de chercheur et sans qui je ne serais pas là.

## Préambule

---

Dans la langue française, le terme "épigénétique" est un adjectif (processus épigénétiques). Dans la langue anglaise, "epigenetics" est à la fois un adjectif et un substantif. La tendance actuelle de la recherche et l'intérêt croissant des chercheurs pour cet aspect particulier de la génétique tend aujourd'hui à individualiser cette discipline, au même titre que l'ont été la métabolomique ou la protéomique. En conséquence, pour la rédaction de ce mémoire de thèse, j'ai utilisé "épigénétique" à la fois comme adjectif et comme substantif.



# Liste des principales abréviations

---

A	: Adénine
AcH3	: Histone H3 acétylée
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ADNc	: Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNg	: Acide désoxyribonucléique génomique
ADP	: Adénosine diphosphate
AG	: AGAMOUS
AP1	: APETALA 1
AP3	: APETALA 3
ARN	: Acide ribonucléique
ARNm	: ARN messenger
ARNr	: ARN ribosomal
ARNs	: petit ARN
At	: Arabidopsis thaliana
ATP	: Adénosine triphosphate
BET	: Bromure d'éthidium
BD	: Bolting delay
BI	: Bolting index
BSA	: Sérum albumine bovine
BvFLC	: Homologue de <i>FLC</i> chez <i>Beta vulgaris</i>
C(s)	: Cytosine(s)
CAF1	: Chromatin assembly factor 1
CenH3	: Cse4 centromeric H3 variant
CENP-A	: Variant centromérique de l'histone H3
CG ou CpG	: Dinucléotide cytosine-guanosine
CHH	: Trinucléotide cytosine-H-H
ChIP	: Immunoprécipitation de la chromatine
CLF	: CURLY LEAF
CLV3	: CLAVATA 3
CMT3	: Chromométhyltransferase 3
CNG	: Trinucléotide cytosine-N-guanosine
Ci	: Curie
CIFRE	: Convention Industrielle de Formation par la Recherche
CO	: CONSTANS
CPR	: Contrat Pour la Recherche
Cy3	: Fluorochrome rouge
Cy5	: Fluorochrome vert
CZ	: Zone centrale
DCL	: Protéine Dicer-like
DD	: Cal dédifférencié
ddc	: Triple mutant <i>drm1 drm2 cmt3</i>
ddm1	: Mutant Decrease DNA methylation 1
DEPC	: Diéthylpyrocarbonate
DME	: Demeter glycosylase
DNMT	: ADN méthyltransférase
dNTP	: Désoxynucléoside triphosphate
DRM	: Domains-rearranged méthyltransférase
dUTP	: Désoxyuracile triphosphate
ddUTP	: Didésoxyuracile triphosphate
EDTA	: Ethylene diamine tetraacetic acid
ELF	: EARLY FLOWERING
EST	: Express sequence tag
ETBE	: Ethyl tertio butyl
FAO	: Formes activées de l'oxygène

## Liste des abréviations

---

FCA	: Protéine FCA
FD	: Protéine FD
FLC	: FLOWERING LOCUS C
FLD	: FLOWERING LOCUS D
FLK	: FLOWERING LATE KH DOMAIN
FPA	: FLORAL PROMOTER AUTONOMOUS PATHWAY
FRI	: FRIGIDA
FRL1	: FRIGIDA-LIKE1
FRL2	: FRIGIDA-LIKE2
FT	: FLOWERING LOCUS T
FVE	: Protéine FVE
FWA	: Protéine FWA
FY	: Protéine FY
G	: Guanine
HAT	: Histone acétylase
HCl	: acide chloridrique
HDAC	: Histone désacétylase
HKMT	: histone lysine méthyltransférase
HMT	: histones méthyltransférases
HPLC	: chromatographie liquide à haute performance
HRMT	: histone arginine méthyltransférase
H1	: Histone de liaison
H2A	: Histone 'de cœur' H2A
H2B	: Histone 'de cœur' H2B
H3	: Histone 'de cœur' H3
H4	: Histone 'de cœur' H4
H3.2	: variant de l'histone H3 de type 2
H3.3	: variant de l'histone H3 de type 3
H3K4 <sup>me</sup>	: histones H3 méthylées sur la lysine 4
H3K9 <sup>me</sup>	: histones H3 méthylées sur la lysine 9
H3K27 <sup>me</sup>	: histones H3 méthylées sur la lysine 27
H3K36 <sup>me</sup>	: histones H3 méthylées sur la lysine 36
ICD	: Domaine interchromatinien
ICN	: Réseau interchromosomique
JmJC	: Domaines Jumanji
K4	: Lysine 4
LD	: LUMINIDEPENDENS
LFY	: LEAFY
LHP1	: LIKE HETEROCHROMATIN1
LSD	: Lysine specific demethylase
McrBC	: Methylcytosine restriction enzyme
MAL	: Substrat artificiel permettant de quantifier la désacétylation des histones
MBD	: Methyl Binding Domain
MBP	: Protéine de type 'methyl-binding'
mC (s)	: Méthylcytosine (s)
MET1	: ADN méthyltransférase 1
MgCl <sub>2</sub>	: Dichlorure de magnésium
MS-PCR	: Methylessensitive-PCR
NaCl	: Chlorure de sodium
NAP	: Nucleosome Assembly Protein
NO	: Non-organogenic callus line
O	: Cal organogène
ORF	: Open reading frame
Pc	: Protéine Polycomb
PCA	: Analyse en composante principale
PCR	: Réaction en chaîne de polymérisation
PIE1	: PHOTOPERIOD INDEPENDENT EARLY FLOWERING1
PRC2	: Complexe polycomb 2
PRMT	: Arginine-méthyltransférases

## Liste des abréviations

---

PZ	: Zone périphérique
RdDM	: Méthylation ARN-dépendante
RDR2	: ARN polymérase ARN dépendante
RLGS	: Restriction landmark genome scanning
RT-PCR	: Réaction en chaîne de polymérisation après transcription inverse
ROS	: Reactive oxygen species
ROS 1	: Repressor of silencing 1
RZ	: Zone de soutien
SAM	: S-adénosyl-L-méthionine
SDS	: Sodium dedodécyl sulfate
SE	: Erreur Standard
siRNA	: Short interfering RNA
SNF	: Sucrose non-fermenting
SOC1	: SUPPRESSER OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1
SOD	: Superoxide dismutase
sp	: Espèce
SWI	: SWItching mating type
T (s)	: Thymine (s)
TAE	: Tris acétate EDTA
TBE	: Tris borate EDTA
T <sub>m</sub>	: Température d'hybridation
T <sub>m</sub> <sub>th</sub>	: Température d'hybridation théorique
U(s)	: Uracile
UV	: Ultra-violet
VIN3	: VERNALIZATION INSENSITIVE 3
VIP4	: VERNALIZATION INDEPENDENCE 4;
VRN1	: VERNALIZATION 1
VRN2	: VERNALIZATION 2
WUS	: WUSCHEL



# Sommaire

---

<b>Introduction : L'épigénétique et son rôle dans le développement chez les plantes</b>	<b>21</b>
1. Le concept de développement des plantes et son contrôle	24
1.1. La notion de développement des plantes	24
1.2. Le contrôle du développement des plantes	27
1.2.1. Le rôle des facteurs environnementaux	27
1.2.2. Le rôle des phytohormones	27
1.2.3. Les mécanismes moléculaires de régulation de l'expression des gènes	27
2. L'épigénétique : définitions et rôle dans la vie des plantes	28
2.1. Epigénétique <i>versus</i> génétique	28
2.2. Mise en évidence d'un contrôle épigénétique dans la vie de la plante	31
3. La chromatine : siège d'un contrôle épigénétique	34
3.1. Organisation de la chromatine à l'échelle du noyau	34
3.1.1. Membrane nucléaire et nucléoles	34
3.1.2. Les territoires chromosomiques	34
3.1.3. Interfaces entre territoires chromosomiques	35
3.2. Structure de la chromatine	37
3.3. Structure du nucléosome	37
3.4. Territoires chromatiniens	40
3.4.1. L'euchromatine	40
3.4.2. L'hétérochromatine	41
3.4.2.1. <i>Propriétés</i>	41
3.4.2.2. <i>Hétérochromatine constitutive</i>	42
3.4.2.3. <i>Hétérochromatine facultative</i>	42



3.5. Assemblage et remodelage de la chromatine	44
3.5.1. Les différentes étapes de l'assemblage de la chromatine	44
3.5.2. Les facteurs de remodelage du nucléosome	44
3.6. Les principaux mécanismes modifiant la nature de l'ADN et des histones	46
3.6.1. La méthylation de l'ADN	47
3.6.1.1. Définition	47
3.6.1.2. Les classes d'ADN méthyltransférases	49
3.6.1.3. La déméthylation	51
3.6.2. Les modifications post-traductionnelles des histones	52
3.6.2.1. L'acétylation des histones	53
3.6.2.2. La méthylation des histones	54
3.6.2.3. Les autres modifications	55
3.6.2.4. Mécanismes moléculaires d'interaction entre la méthylation de l'ADN et les modifications des histones	55
3.6.2.5. L'hypothèse du code histone	57
3.6.3. Les variants d'histones	57
3.6.3.1. Généralités	57
3.6.3.2. L'exemple d'un variant centromérique	58
4. Objectifs de la thèse	59

<b>Chapitre 1: Mise au point d'une stratégie pour la recherche et la validation de marqueurs épigénétiques : application à la morphogenèse <i>in vitro</i> chez la betterave sucrière</b>	<b>61</b>
Introduction	64
1. La betterave sucrière : la plante modèle	65
1.1. Sa biologie	65
1.2. Sa culture	67
1.3. Son amélioration et son exploitation	68
2. Stratégie et méthodes pour l'étude des phénomènes épigénétiques	71
<b><i>Publication n°1</i></b>	<b>73</b>
3. Compléments pour l'étude des marques épigénétiques à l'échelle du génome : le cas du méthylome de l'ADN	95
3.1. "McrBC arrays"	95
3.2. "ChIP tiling microarrays"	97
4. Application à la morphogenèse <i>in vitro</i> chez la betterave sucrière	98
<b><i>Publication n°2</i></b>	<b>103</b>
5. Compléments sur la validation des biomarqueurs épigénétiques dans le cadre de la sélection assistée par marqueurs	121
5.1. Caractérisation de marqueurs épigénétiques supplémentaires par RLGS	122
5.2. Criblage des marqueurs épigénétiques	127
5.2.1. Méthodes	128
5.2.1.1. <i>Traitement de l'ADN génomique au bisulfite de sodium</i>	128
5.2.1.2. <i>Conception d'amorces oligonucléotidiques pour l'amplification par PCR</i>	131
5.2.1.3. <i>Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)</i>	132
5.2.1.4. <i>Séquençage et analyse des séquences</i>	134
5.2.2. Résultats	137
5.2.2.1. <i>Traitement au bisulfite et vérifications</i>	137
5.2.2.2. <i>Conception des amorces PCR et amplification PCR spécifique</i>	139
5.2.2.3. <i>Purification des amplicons PCR et purification des produits de la réaction de séquence.</i>	141
5.2.2.4. <i>Profils de méthylation des marqueurs</i>	142
6. Discussion et perspectives (Contrat de recherche 222N avec SES-VanderHave et <b><i>projet de publication n°3</i></b> )	145

<b>Chapitre 2: Mise en évidence d'un contrôle épigénétique de la vernalisation et de la dévernalisation chez la betterave sucrière</b>	<b>153</b>
Introduction	157
1. La vernalisation : état de l'art	159
1.1. Définition	159
1.2. Caractéristiques de la vernalisation	161
1.3. Sites de perception et nature du signal de la vernalisation	161
1.4. Mémoire de la vernalisation et contrôle épigénétique chez la plante modèle <i>Arabidopsis</i>	163
1.5. Gènes cibles du contrôle épigénétique chez <i>Arabidopsis</i>	167
2. Mise en évidence d'un contrôle épigénétique de la vernalisation, de la dévernalisation et des variations génétiques chez des hybrides de betterave sucrière	176
<b><i>Publication n°4</i></b>	<b>182</b>
3. Résultats complémentaires	227
Discussion et perspectives	231

<b>Chapitre 3: Recherche et validation de biomarqueurs de la sensibilité à la montaison chez la betterave sucrière</b>	<b>235</b>
Introduction	239
1. Contexte et objectifs	241
2. Caractérisation des épimutations induites lors de la vernalisation chez la betterave sucrière et identification de biomarqueurs épigénétiques de la sensibilité à la montaison	243
<b><i>Publication n°5</i></b>	<b>245</b>
Discussion et perspectives	271

**Conclusion et Perspectives**

**273**

**Valorisation des travaux scientifiques**

**279**

**Références Bibliographiques**

**281**

# Introduction

L'épigénétique et son rôle dans le  
développement des plantes

---



# Introduction

## L'épigénétique et son rôle dans le développement des plantes

---

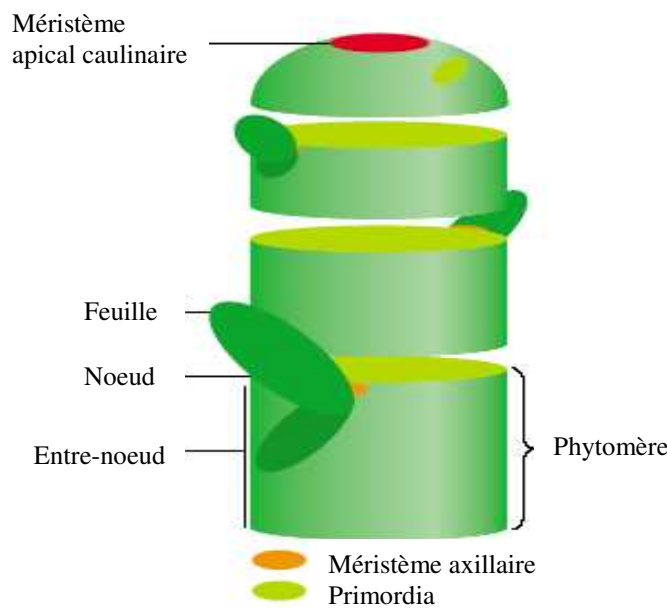
1. La notion de développement des plantes et son contrôle
2. L'épigénétique : définitions et rôle dans la vie des plantes
3. La chromatine : siège d'un contrôle épigénétique
4. Objectifs de la thèse



# 1. La notion de développement des plantes et son contrôle

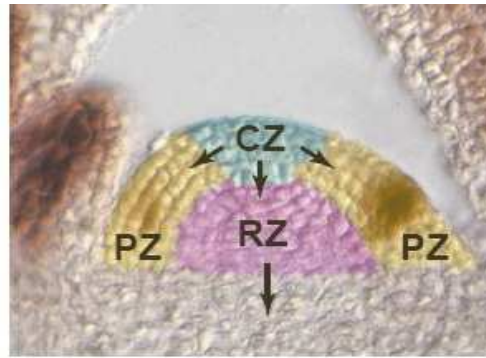
## 1.1. Le concept de développement des plantes

Le développement est défini comme l'ensemble de toutes les modifications qui participent à l'élaboration progressive du corps d'un organisme (Srivastava, 2001). Chez les plantes, ces modifications permettant la transformation d'un zygote en une plante adulte appartiennent à deux grands processus : la croissance et la morphogenèse (Beemster *et al.*, 2003). La division et l'élongation des cellules entraînent une augmentation irréversible de leur taille, responsable de la **croissance** de la plante. La **morphogenèse**, qui caractérise la mise en place des formes, s'opère au sein de zones spécialisées appelées **méristèmes** (Figures 1 et 2 ; Bowman et Eshed, 2000 ; Carles et Fletcher, 2003).



**Figure 1.** Le méristème apical caulinaire est un système qui fournit les cellules pour les parties aériennes de la plante. La croissance modulaire de la tige est illustrée dans ce modèle tridimensionnel. La plante produit de façon itérative des unités appelées “phytomères” composés d'une ou plusieurs feuilles, attachés à un nœud, d'un entre-nœud et d'un bourgeon “méristème axillaire” à la base de la feuille. Selon leur position sur la tige, les phytomères diffèrent par la taille et la forme des feuilles, la longueur des entre-nœuds et le potentiel du méristème axillaire (d'après Carles et Fletcher, 2003).

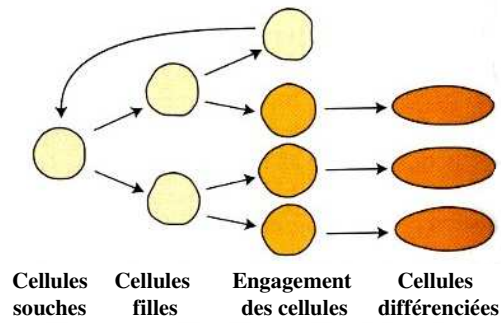
Chaque organe possède différents types cellulaires spécialisés pour des fonctions. Cette acquisition de spécificités structurales et fonctionnelles des cellules est progressive et correspond à la différenciation cellulaire (Figures 3 et 4 ; Clos *et al.*, 2002 ; Taiz et Zeiger, 2006). La première étape de la différenciation cellulaire est appelée engagement ou détermination. L'engagement est ainsi caractérisé par la mise en place des polarités et du plan



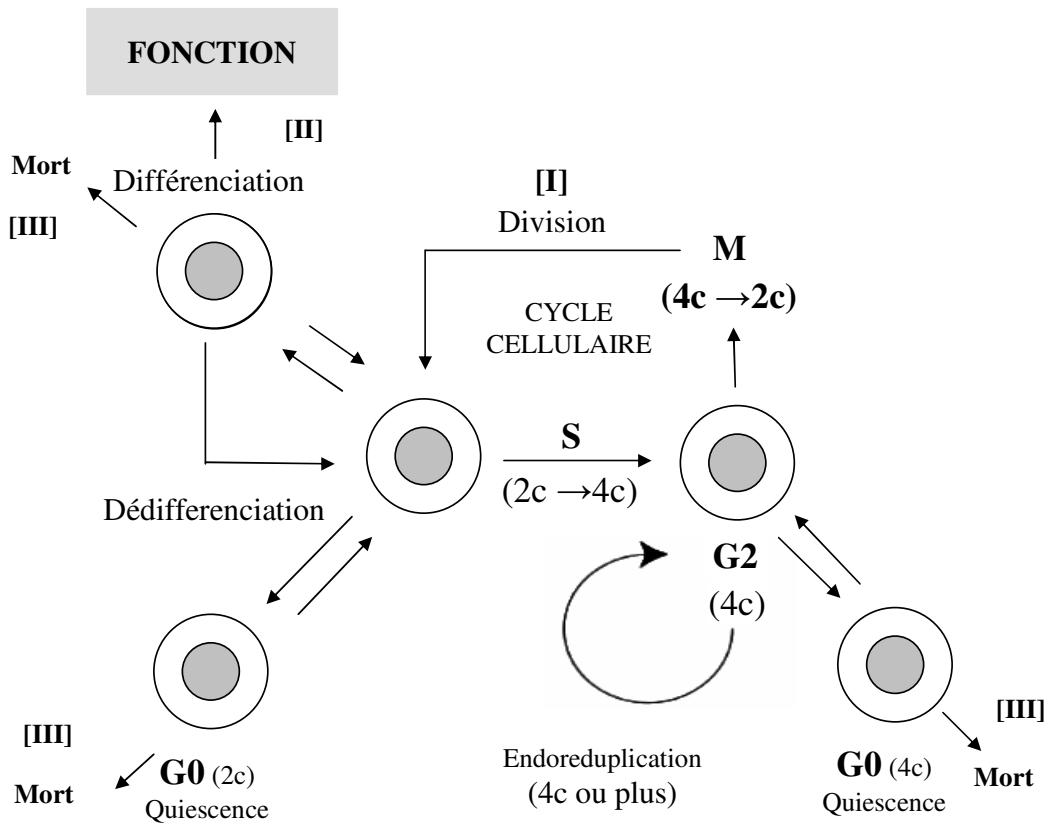
**Figure 2.** Zonation cyto-histologique du méristème caulinaire de la tige. Des organes latéraux sont produits à partir de cellules recrutées dans la zone périphérique (PZ), alors que la plus grande partie des cellules de la tige provient de celles recrutées de la zone de soutien (RZ). La zone centrale (CZ) se comporte comme un réservoir de cellules “souches” qui fournit la zone périphérique et la zone de soutien, tout en maintenant l’intégrité de la zone centrale (Bowman and Eshed, 2000).

d’organisation (Figure 3 ; Taiz et Zeiger, 2006). En termes moléculaires, cela correspond à la restriction des parties du génome pouvant être transcrites dans une cellule ou ses cellules filles. La détermination est totale lors de la différenciation cellulaire, laquelle est souvent accompagnée de changements ultrastructuraux et phénotypiques, voire même d’une mort cellulaire (Srivastava, 2001 ; Clos *et al.*, 2002). Néanmoins, les cellules végétales conservent un potentiel de différenciation : c’est la totipotence. Elle s’exprime chez toutes les cellules végétales non engagées, mais aussi chez des cellules différenciées (vivantes) après une dédifférenciation et une redifférenciation. La dédifférenciation (Figure 4) est un changement de programme génétique d’une cellule qui “réprime” les gènes qui étaient transcrits en connexion avec la fonction établie de la cellule. Ceci est normalement suivi par l’induction de nouveaux ensembles de gènes et par leur transcription : c’est la redifférenciation qui permet l’ajustement à de nouvelles conditions. La mort cellulaire programmée (Figure 4) est également un élément essentiel de la croissance et du développement chez de nombreux organismes eucaryotes (Buchanan *et al.*, 2000).

La plasticité développementale décrit l’aptitude d’un organisme à changer de forme, de port ou de croissance en réponse à une modification des paramètres environnementaux (Pigliucci, 2001 ; Weigel et Jürgens, 2002). En comparaison avec les organismes animaux, le développement des plantes est caractérisé par une extrême plasticité. Les plantes sont des organismes fixés qui ont dû s’adapter ou s’accommoder à leur environnement et à ses variations. Il est donc particulièrement intéressant d’étudier les mécanismes contrôlant le développement des plantes au vu de ces particularités.



**Figure 3.** Les cellules souches produisent des cellules filles dont certaines restent non engagées et conservent les propriétés des cellules souches, alors que d'autres s'engagent dans des processus de détermination et de différenciation cellulaires (d'après Taiz and Zeiger, 2006)



**Figure 4.** Schéma du “triptyque cellulaire” montrant les principales étapes que chaque cellule doit franchir pour sa formation par division (I), sa différenciation (II) et éventuellement sa mort cellulaire programmée (III). Dans certains cas, les cellules peuvent être dédifférenciées/redifférenciées ou bloquées en G2 et subir une endoreduplication (D’après Clos *et al.*, 2002).

## 1.2. Le contrôle du développement des plantes

### 1.2.1. Le rôle des facteurs environnementaux

Les stimuli environnementaux sont perçus par des récepteurs et induisent des modifications locales et/ou systémiques de la programmation génomique. Parmi les signaux affectant la vie de la plante, les plus importants sont la lumière, la gravité, la température, l'eau et la composition en gaz atmosphériques.

La lumière, par exemple, est utilisée par les plantes, non seulement comme une source d'énergie pour la photosynthèse, mais aussi comme un signal pour la croissance et la morphogénèse. Puisque la lumière peut varier par sa qualité, sa quantité, sa durée ou sa direction, les plantes ont développé des récepteurs qui perçoivent les variations de ce signal. Il y a en effet trois types de photorécepteurs : les phytochromes, les cryptochromes et les phototropines (Sullivan et Deng, 2003 ; Hagège, 2004).

### 1.2.2. Le rôle des phytohormones

Les phytohormones sont des molécules "signal" qui se fixent sur des récepteurs spécifiques. Elles contrôlent le développement des plantes, mais présentent une faible spécificité comparée aux hormones animales. Les phytohormones jouent des rôles multiples dans la croissance et le développement des plantes par le biais de variations de concentration et/ou de sensibilité des tissus. Les phytohormones agissent souvent en réponse à des facteurs environnementaux (Buchanan *et al.*, 2000 ; Srivastava, 2001). La complexité est également due au fait que plusieurs phytohormones peuvent agir ensemble ou séquentiellement dans le temps. Ces interactions peuvent être antagonistes ou synergiques.

### 1.2.3. Les mécanismes moléculaires de régulation de l'expression des gènes

Divers mécanismes permettent de contrôler l'expression des gènes dans les cellules eucaryotes. Tout d'abord, au niveau de la transcription, avec la présence d'éléments *cis* constitués de séquences génomiques amplificatrices ou inactivatrices, de protéines se liant à l'ADN tels que les facteurs de transcription et des protéines variées du complexe de transcription. Ensuite, au niveau des ARNm obtenus. Leurs taux pourront être régulés lors de la phase de maturation et selon leurs différentes sensibilités à la dégradation. Enfin, la

protéine codée peut aussi être modifiée par un contrôle post-traductionnel tel que la phosphorylation, la glycosylation, la sulfonation ou l'ubiquitinylation ; et son taux d'expression également contrôlé par le phénomène de protéolyse.

Il existe un autre niveau de contrôle : c'est l'hérédité de la chromatine et le contrôle épigénétique. Ce point, objet de ce travail de thèse, sera détaillé dans cette introduction.

## 2. L'épigénétique : définitions et rôle dans la vie des plantes

### 2.1. Epigénétique *versus* génétique

L'ADN est le support matériel de l'hérédité. L'amélioration du séquençage systématique du génome de divers organismes, renseigne de mieux en mieux sur le lien existant entre les séquences ADN et les caractères (phénotypiques) mais également sur la structuration du génome (séquences répétées, codantes...). En parallèle, des études montrant des cas de transmissions non mendéliennes de caractères comme l'inactivation aléatoire du chromosome X chez la femme ou les paramutations chez le maïs, suggèrent que la séquence nucléotidique n'est pas le seul déterminant de l'expression et de l'hérédité de caractères (McClintock, 1951 ; Russell, 1963 ; Allis *et al.*, 2007b). En effet, l'hérédité cytoplasmique (ADN extranucléaire des mitochondries et chloroplastes) et l'hérédité portée par la chromatine (modifications chimiques de ses constituants) sont deux processus majeurs qui font l'objet de nombreuses études ces dernières années. L'hérédité de la chromatine correspond à des changements dits **épigénétiques**.

Dans sa globalité, le génome possède donc deux types d'informations : (1) l'information génétique, basée sur les séquences d'ADN formant la double hélice et (2) une information **épigénétique** qui agit comme un régulateur de l'information portée par les séquences d'ADN (Figures 5 et 6 ; Verschure *et al.*, 2006 ; Allis *et al.*, 2007b). A son origine, le terme "épigénétique" fut utilisé pour décrire des phénomènes non expliqués par la génétique. Ainsi, Waddington (1942) définit l'épigénétique comme "the branch of biology which studies the causal interactions between genes and their products, which bring the phenotype into being".

On parle alors d'épimutations qui, contrairement aux mutations, n'induisent pas de modifications de la séquence de l'ADN. L'ensemble des épimutations dans un génome constitue l'épigénome (Qiu, 2006). Les épimutations impliquent des modifications du profil

génétique de certain loci. Dans le cas où ces modifications affectent un gène, son expression en devient changée et d'importantes transformations phénotypiques peuvent apparaître. Par conséquent, on utilise le terme d'épiallèle pour signifier qu'un même gène peut exister sous différents états épigénétiques, responsable de variations du phénotype. Finnegan (2001) considère les épimutations comme des générateurs d'épiallèles d'un même gène.

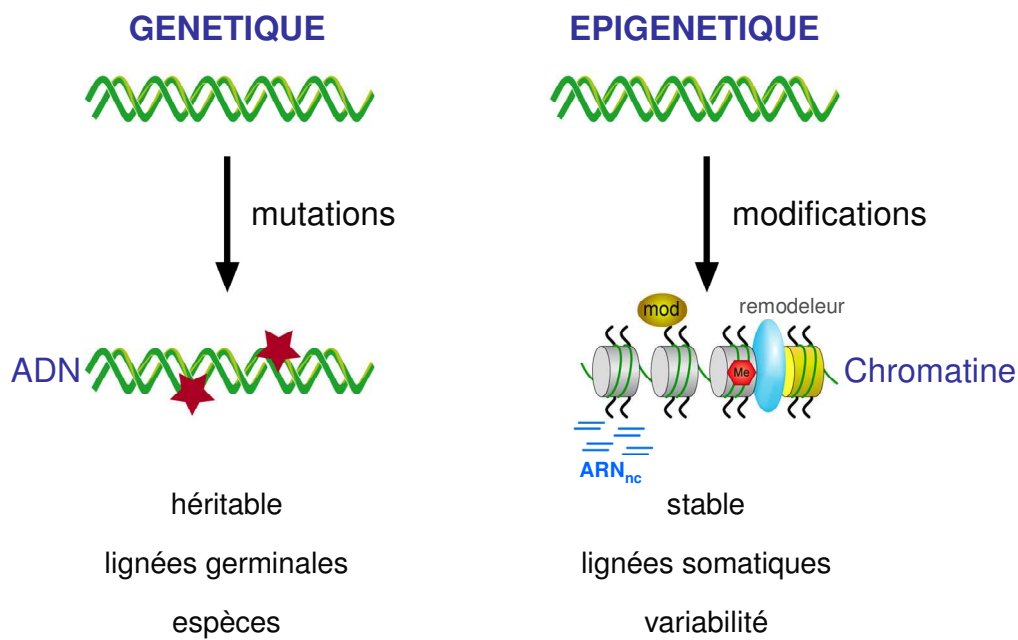


Figure 5. Génétique versus épigénétique (d'après Allis *et al.*, 2007b)

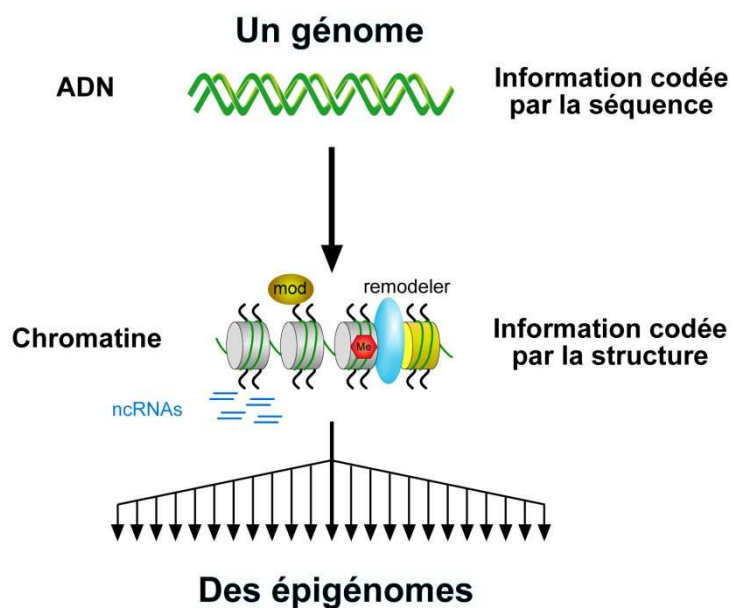
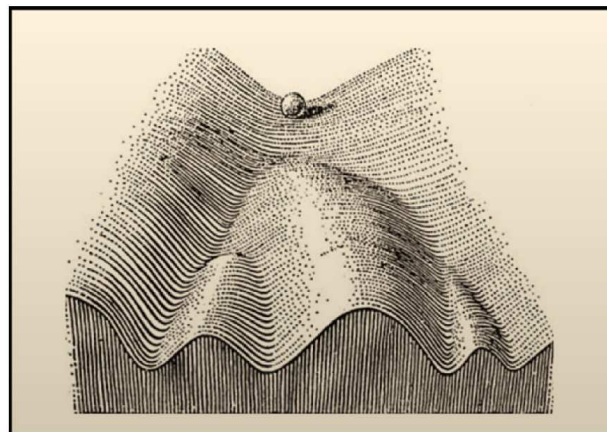


Figure 6. Un génome, des épigénomes (d'après Allis *et al.*, 2007b). Un génome donné peut générer une multitude d'épigénomes.

L'épigénétique peut être considérée comme un pont entre le génotype et le phénotype, un phénomène qui modifie le produit final d'un locus ou d'un chromosome sans changer la séquence d'ADN sous-jacente. Bien que toutes les cellules d'un même organisme possèdent un génotype identique, leurs fonctions diffèrent. La différenciation cellulaire au cours du développement peut être considérée comme un phénomène épigénétique, gouverné par des changements que Waddington (1957) décrivait comme le "paysage épigénétique" (Figure 7). Russo (1996) ajoute la notion d'héritabilité de l'information épigénétique et considère l'épigénétique comme "l'étude des modifications stables et héréditaires (par la mitose et/ou la méiose) changeant l'expression des gènes ou l'identité des cellules, sans modification de la séquence d'ADN". Cependant, certaines modifications affectant les histones, la composition de petits ARN et des protéines liant l'ADN (comme les protéines polycomb) sont impliquées dans des changements, à court terme, d'orientations de l'expression du programme génétique.



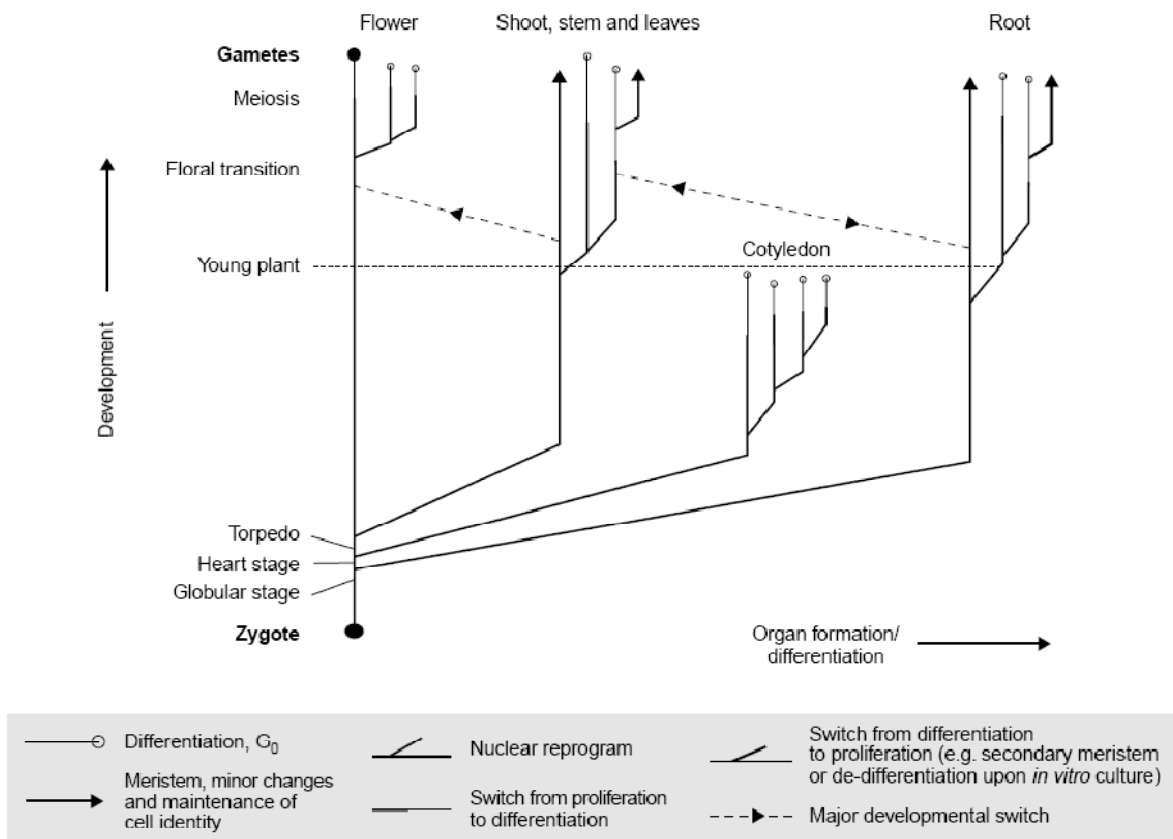
**Figure 7.** Le modèle du "paysage épigénétique" de Waddington. La métaphore du paysage épigénétique proposé par Waddington représente le processus de "prise de décision cellulaire" au cours du développement. La cellule (la bille) peut prendre différentes trajectoires spécifiques possibles menant à différents "destins cellulaires" (Waddington, 1957).

Ceci suggère la généralisation du terme épigénétique à tout phénomène de régulation génomique qui ne dépend pas directement d'une régulation localisée au niveau de la séquence d'ADN (Verschure *et al.*, 2006). En général, les mécanismes épigénétiques régulent différents processus nucléaires, tels que la transcription, la réplication, la réparation de l'ADN, la recombinaison ou la stabilité du génome. Cette régulation intervient au niveau de la chromatine. Sans altérer le code de l'ADN en lui-même, les modifications de domaines chromatinien influencent l'accessibilité de ce code aux facteurs qui le lisent et le traduisent. Ces modifications sont capables de rendre un gène accessible, donc d'augmenter son taux

d'expression. Elles peuvent aussi désactiver un gène en le rendant inaccessible. A la différence du code génétique qui ne peut être que lu, le code épigénétique peut être lu, réécrit ou effacé. Ce caractère réversible du contrôle épigénétique est prometteur dans la recherche d'outils utilisables dans divers domaines de la biologie animale ou végétale, avec des applications concrètes en médecine ou en agronomie.

## 2.2. Mise en évidence d'un contrôle épigénétique dans la vie de la plante

De même que les mutations, les épimutations apparaissent de manière spontanée tout au long du développement (Figure 8 ; Fransz et De Jong, 2002), ou bien sont induites (Finnegan, 2001). En effet chez les plantes, l'exposition à des facteurs épimutagènes telles que la 5-azacytidine ou une culture prolongée en conditions *in vitro* est responsable de l'apparition d'épimutations participant au phénomène de variations somaclonales (Burn *et al.*, 1993 ; Kaepler *et al.*, 2000 ; Joyce *et al.*, 2003).



**Figure 8.** Schéma des différents changements épigénétiques "switch" qui accompagnent le développement des plantes (Fransz et De Jong, 2002).



Des mutations dans des gènes impliqués dans la dynamique de la chromatine peuvent également induire des épimutations comme cela est le cas chez le mutant *decrease in DNA methylation 1 (ddm1)* d'*Arabidopsis* (Finnegan et Denis, 1993 ; Vong *et al.*, 1993 ; Richards, 1997). Ces mutants présentent un taux de méthylation réduit, aussi bien dans les motifs CG que dans les motifs CNG (où N = A, T, C ou G) (Finnegan et Denis, 1993 ; Vong *et al.*, 1993 ; Richards, 1997 ; Kishimoto *et al.*, 2001 ; Gendrel *et al.*, 2002). Chez ces mutants, les feuilles sont en nombre élevé et de forme arrondie et la floraison est tardive (Figure 9). Ces observations suggèrent que l'hypométhylation de l'ADN des plantes pourrait être responsable d'un développement anormal. Des plantes transgéniques dont l'activité ADN méthyltransférase 1 est inhibée et donc consécutivement hypométhylées pour leur ADN, présentent également plusieurs anomalies de développement et une expression aberrante de certains gènes homéotiques impliqués dans la floraison (Ronemus *et al.*, 1996 ; Finnegan *et al.*, 1996 ; Kishimoto *et al.*, 2001). Ces effets sont transmissibles au cours des divisions cellulaires et se maintiennent pendant plusieurs générations de plantes. Dans l'exemple ci-dessus abordé, les anomalies du développement s'observent jusqu'aux descendants de troisième génération (F3) des plants d'*Arabidopsis* transgéniques. Les plantes filles présentent toujours de faibles niveaux de méthylation de l'ADN, et ceci même dans les plantes qui n'ont plus de transgène (Finnegan *et al.*, 1996). Une telle situation ne se trouve pas dans les cellules animales ce qui suggère une évolution divergente de la méiose.

Certains facteurs environnementaux provoquent également l'apparition d'épimutations au cours du développement des plantes : c'est le cas de la température (vernalisation et dormance des bourgeons) et de la lumière (Finnegan *et al.*, 1996 ; Ronemus *et al.*, 1996 ; Finnegan *et al.*, 1998 ; Michaels et Amasino 1999 ; Johanson *et al.*, 2000 ; Sheldon *et al.*, 2000 ; Michaels et Amasino, 2001 ; Horvath *et al.*, 2003 ; Wagner, 2003 ; Amasino, 2004 ; Sung et Amasino, 2004a).

Dans les génomes eucaryotes, les contrôles épigénétiques s'exercent principalement sur les transposons à ADN, les rétrotransposons et leurs reliques, constituants majeurs de nombreux génomes animaux ou végétaux (Martienssen et Colot, 2001). Les mécanismes épigénétiques sont également impliqués dans divers autres processus biologiques. C'est le cas pour l'inactivation du chromosome X chez les mammifères femelles, pour certaines maladies comme certains cancers chez l'Homme, pour le phénomène d'empreinte parentale et de polyploïdisation chez les plantes (Xu *et al.*, 1999 ; Finnegan, 2001 ; Jones et Takai, 2001 ; Martienssen et Colot, 2001 ; Frühwald et Plass, 2002 ; Qiu, 2006).



**Figure 9.** Phénotypes à différents stades de développement d'écotypes d'*Arabidopsis* sauvages (Wild type) et transgéniques (*Met1* antisense) inhibés pour l'ADN méthyltransférase 1. Les plantes transgéniques présentent plusieurs anomalies phénotypiques et en particulier une fleur modifiée (Buchanan *et al.*, 2000).

Chez les plantes, les phénomènes épigénétiques sont impliqués à la fois dans le déroulement normal du programme de développement mais également dans leur grande plasticité développementale, comparativement aux animaux. En conséquence, de nombreuses équipes de recherche étudient les mécanismes moléculaires du contrôle épigénétique. Parmi ces mécanismes, la méthylation de l'ADN tient un rôle important mais encore mal compris. Dans le cadre de cette thèse, ce mécanisme sera plus particulièrement détaillé ci-après.

### 3. La chromatine : siège d'un contrôle épigénétique

Dans ce chapitre sont présentés les différents niveaux d'organisation de la chromatine. L'organisation du patrimoine génétique en lien avec des mécanismes épigénétiques commence avec l'architecture du noyau et en particulier la disposition en son sein des chromosomes. Les caractéristiques de la chromatine ainsi que les mécanismes affectant sa composition et sa structure seront présentés dans un deuxième temps.

#### 3.1. Organisation de la chromatine à l'échelle du noyau

##### 3.1.1. Membrane nucléaire et nucléoles

Le noyau de chaque cellule mesure seulement 10  $\mu\text{m}$  de diamètre, mais doit cependant contenir pas moins de deux mètres d'ADN. Par conséquent, cette énorme quantité de chromatine doit être organisée de façon non aléatoire de manière à permettre une action rapide de la machinerie protéique régulant les fonctions de la chromatine (réplication, recombinaison, réparation). À la fin de XIX siècle, Rabl fut le premier à proposer que le noyau était un organe compartimenté et que cette architecture pouvait jouer un rôle important dans l'organisation de la chromatine (d'après Dupont, 2006). L'enveloppe séparant le noyau du reste de la cellule est composée d'une membrane interne et d'une membrane externe entre lesquelles se trouve l'espace péri-nucléaire. La surface interne de la membrane nucléaire interne est tapissée de protéines formant un feutrage de filaments appelé la lamina (Figure 10 ; Dechat *et al.*, 2008). La lamina qui joue un rôle d'interactions entre les protéines de la membrane interne et la chromatine, intervient dans la régulation de l'expression des gènes en influençant la réplication et la transcription. Par le biais de la lamina, l'enveloppe nucléaire participe à l'organisation de la chromatine dans le noyau. Outre sa paroi et la chromatine qui le constituent, le noyau contient des structures fonctionnelles liées à la synthèse d'ARNr, appelées nucléoles.

##### 3.1.2 Les territoires chromosomiques

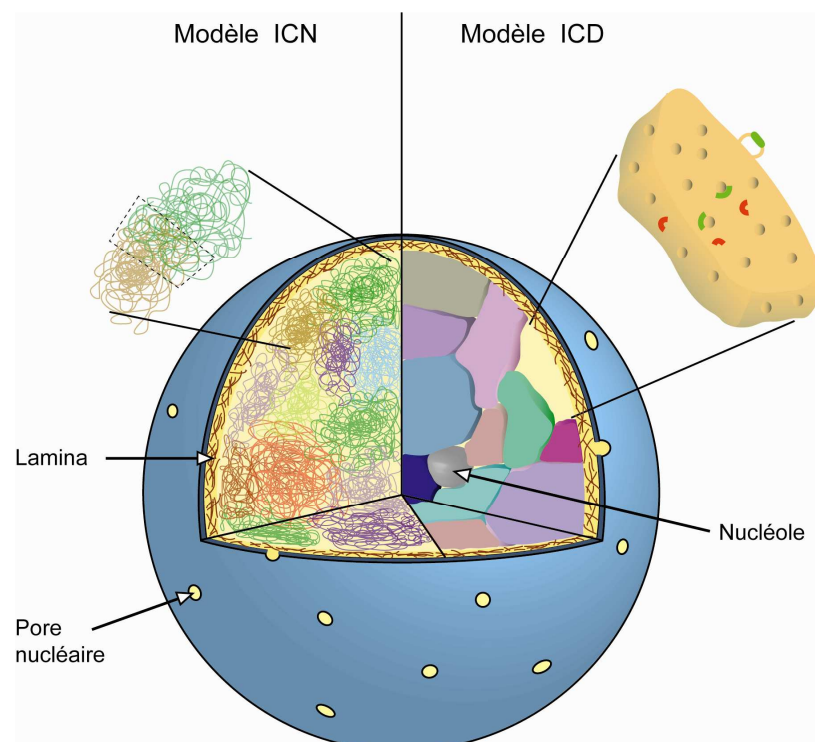
Depuis les années 80, des études ont montré que chaque chromosome occupe un territoire bien délimité au sein du noyau, pendant l'interphase. En termes de compartimentation, ces territoires chromatiniens diffèrent des nucléoles car ils sont

perméables. Les territoires chromosomiques ne sont pas disposés de façon aléatoire mais sont organisés en fonction de leur taille et de leur contenu en gènes. Ainsi, les petits chromosomes sont préférentiellement localisés au cœur du noyau tandis que les plus grands sont situés près de la membrane nucléaire. Pour une taille similaire, un chromosome plus riche en gènes est situé plus près du centre qu'un chromosome pauvre en gènes.

### 3.1.3 Interfaces entre territoires chromosomiques

Deux modèles existent pour rendre compte des relations spatiales entre deux territoires chromosomiques voisins.

Dans le modèle ICD (Interchromatin Domain), l'interface entre deux territoires est dépourvue de chromatine et forme un réseau tridimensionnel de canaux dont le diamètre varie de quelques nanomètres à quelques micromètres. Ce réseau permet la circulation (par diffusion passive) des protéines nécessaires à la transcription et l'exportation des produits au travers des pores nucléaires (Figure 10). En outre, ces espaces pourraient servir à la fois de zone de stockage de macromolécules et de siège aux réactions enzymatiques.



**Figure 10.** Modèles d'organisation spatiale de la chromatine dans le noyau. A droite, le modèle ICD (Interchromatin Domain) et à gauche, le modèle ICN (Interchromosomal Network ; Dupont, 2006).

Dans le modèle ICN (Interchromosomal Network), les frontières des territoires chromosomiques se superposent. On estime que chaque territoire partage environ 40 % de son volume avec ses territoires voisins. Plus la chromatine est compacte, moins il y a de possibilités d'interpénétrations. Celles-ci sont proportionnelles à la richesse du gène et à son activité transcriptionnelle. Dans ce modèle, les protéines nécessaires à la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN ne sont pas confinées dans des espaces spécialisés, mais peuvent circuler librement entre les boucles de chromatine.

Dans les deux modèles, les activités de transcription peuvent être régulées en modifiant l'accessibilité aux gènes. Les gènes actifs sont accessibles aux complexes de transcription lorsqu'ils sont proches d'un espace interchromatinien (ICD) ou lorsqu'ils sont positionnés sur une grande boucle d'ADN (ICN). Cette organisation de la chromatine en fonction de sa localisation dans le noyau permet d'inactiver certains gènes en les rendant inaccessibles à la machinerie transcriptionnelle. Cependant, il n'est pas exclu que cette organisation en territoires chromosomiques puisse, au contraire, être une conséquence de l'activité transcriptionnelle de la cellule. Ceci générerait des régions de chromatine compacte puisque inactive et d'autres plus "aérées" au niveau de zones riches en protéines et ARNm issus de la transcription. La position relative des territoires chromosomiques les uns par rapport aux autres est transmise à l'identique aux cellules filles à chaque division cellulaire. En outre, elle varie en fonction de la lignée cellulaire considérée. L'utilisation de traceurs pendant les phases G1, S et G2 suggère une stabilité de la position des territoires chromosomiques au cours du cycle cellulaire et traduit l'immobilité globale de la chromatine dans le noyau. Ceci s'explique en partie par le fait que la chromatine est ancrée à l'enveloppe nucléaire ou aux nucléoles. Cependant, des mouvements de grande ampleur ( $> 0.5 \mu\text{m}$ ) ont été observés en relation avec un changement de l'activité transcriptionnelle de la cellule. De tels mouvements s'opèrent, par exemple, lors de la réentrée dans le cycle d'une cellule en phase de quiescence. Ces mouvements pourraient jouer un rôle fonctionnel important au cours des processus de différenciation. Ils réguleraient l'expression de certains gènes par un repositionnement dans des régions favorables ou non à la transcription.

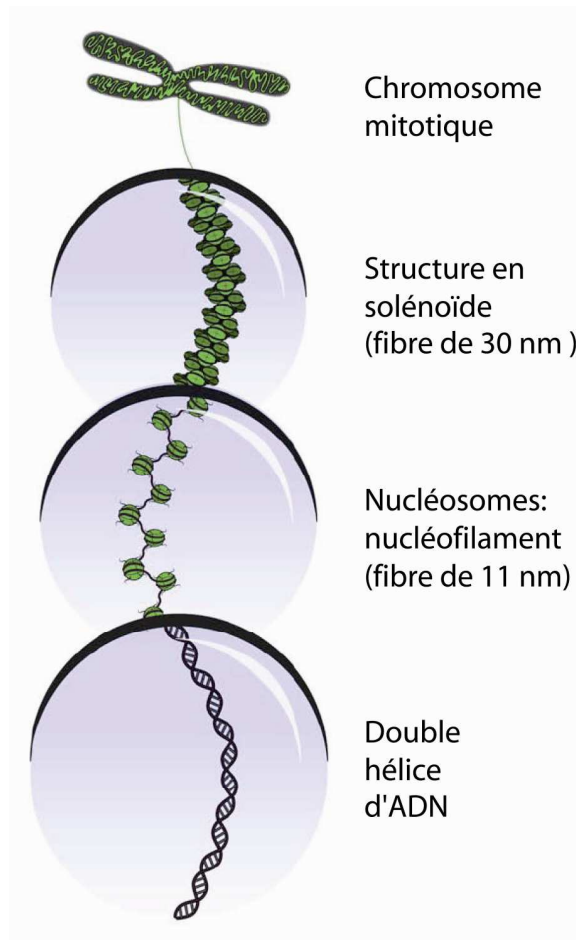
Le noyau est donc un organite qui joue un rôle certainement essentiel dans l'organisation de la chromatine et l'expression des gènes. Cette dernière est également fortement contrôlée par les modifications de la structure même de la chromatine.

### 3.2. Structure de la chromatine

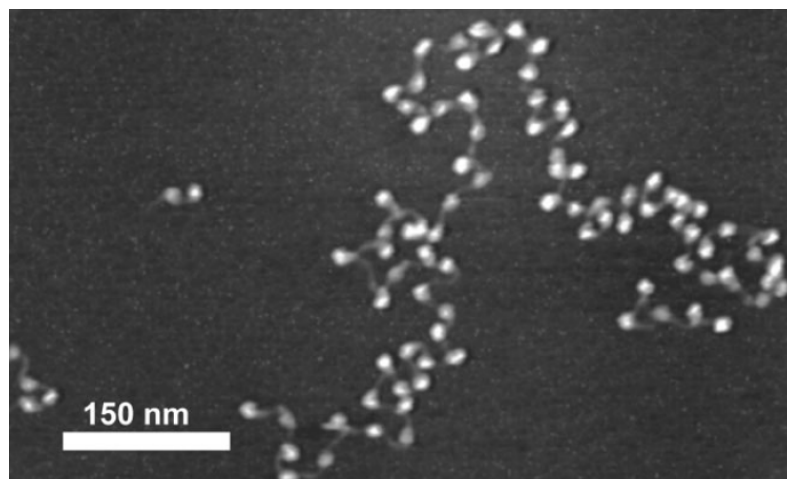
La chromatine (du grec khroma : couleur et sôma : corps), composée d'ADN et de protéines, est la substance chimique constitutive des chromosomes. Elle est présente chez tous les eucaryotes et est susceptible de subir des modifications d'état transmissibles d'une cellule mère à plusieurs cellules filles. La chromatine s'organise en différents niveaux structuraux (Figure 11). Les observations au microscope électronique révèlent une structure en "collier de perles" lorsque la chromatine est déroulée (Figure 12). Chaque perle est formée de 146 paires de bases d'ADN qui s'enroulent autour d'un octamère d'histones pour former le nucléosome (Figure 13). C'est le premier niveau de compaction de l'ADN dans le noyau. La succession des nucléosomes le long de l'ADN forme le nucléofilament. Celui-ci peut adopter des niveaux d'organisation plus compacts. Le niveau de condensation le plus élevé est atteint au sein du chromosome métaphasique (Figure 11).

### 3.3. Structure du nucléosome

Le cœur du nucléosome est composé d'un octamère d'histones comprenant 2 histones H2A + 2 histones H2B + 2 histones H3 + 2 histones H4 autour duquel l'ADN s'enroule sur 1,65 tours (Figure 13 ; Luger *et al.*, 1997 ; Luger, 2003 ; Luger, 2006). Les histones sont des protéines basiques de petite taille, environ 13 kDA, comprenant 100 à 130 acides aminés. Cinq formes d'histones canoniques sont classées dans deux types : (1) les histones "de cœur", H2A (14kDA), H2B (14kDA), H3 (15kDA) et H4 (11kDA) et (2) les histones de liaison, H1 (21 kDA) (Malik et Henikoff, 2003). Chaque histone de cœur possède des extrémités N-terminales et C-terminales (de structure inconnue) localisées à l'extérieur du nucléosome (Figure 14). Ces parties amino-terminales participent entre autres à l'organisation de la chromatine et sont aussi le siège de modifications post-transcriptionnelles.

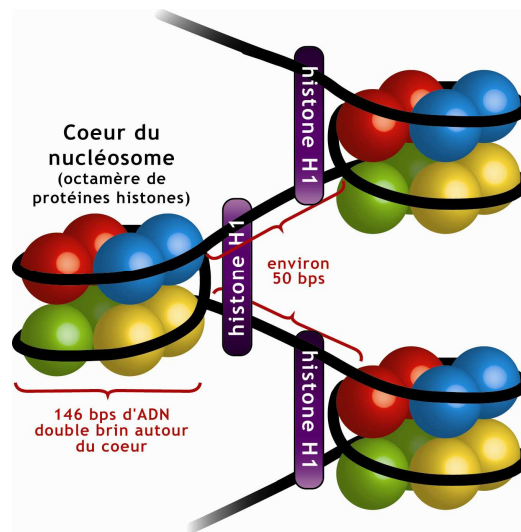


**Figure 11.** Niveaux d'organisation de la chromatine. Le nucléosome qui constitue le premier niveau d'organisation de la chromatine. Le nucléofilament, représentant un enchaînement de nucléosomes formant une fibre de 11 nm de diamètre. Grâce à une histone de liaison (H1) le nucléofilament se structure pour former une fibre de 30 nm de diamètre, appelée structure en solénoïde. Les niveaux d'organisation intermédiaires entre la fibre de 30 nm et le chromosome mitotique sont inconnus (modifié d'après Boulard, 2007).

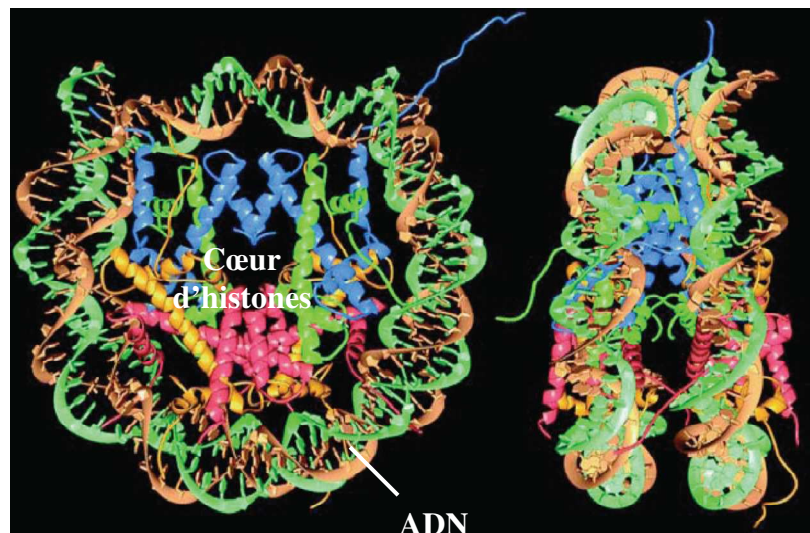


**Figure 12.** Photographie d'un nucléofilament (érythrocyte de poulet) réalisée par cryo-microscopie à force atomique (Shao, 1999). Chaque nucléosome, séparé de son voisin par le linker DNA, mesure ~12-15 nm (taches blanches).

Des liaisons hydrogènes entre l'ADN et les histones assurent la cohésion de l'édifice (Luger *et al.*, 1997). Cette structure confère au nucléosome une géométrie en forme de cylindre aplati d'environ 11 nm de diamètre et 5,5 nm de hauteur (Figure 14). On dénombre 14 points de liaison entre l'ADN et les histones (Luger *et al.*, 1997). Pour cette raison, le nucléosome est un des complexes ADN-protéines les plus stables dans des conditions physiologiques. Cette structure stable et compacte du nucléosome est un frein à de nombreux processus biologiques. Il est, par exemple, responsable de l'inhibition de la transcription (Izban et Luse, 1991).



**Figure 13.** Détail d'un segment de nucléofilament. Les nucléosomes sont séparés par ~50 paires de bases d'ADN (modifié d'après Buchanan *et al.*, 2000).



**Figure 14.** Structure cristallographique du nucléosome représentée vue de dessus (à gauche) et vue de côté (à droite). L'octamère d'histones est formé d'un assemblage de deux copies de chacune des quatre histones (H3 en bleu, H4 en vert, H2A en orange et H2B en magenta) autour duquel s'enroulent 146 paires de bases de la molécule d'ADN. Les parties N-terminales des histones sont vers l'extérieur du nucléosome et interagissent avec le sillon mineur de l'ADN (Lodish *et al.*, 2000).

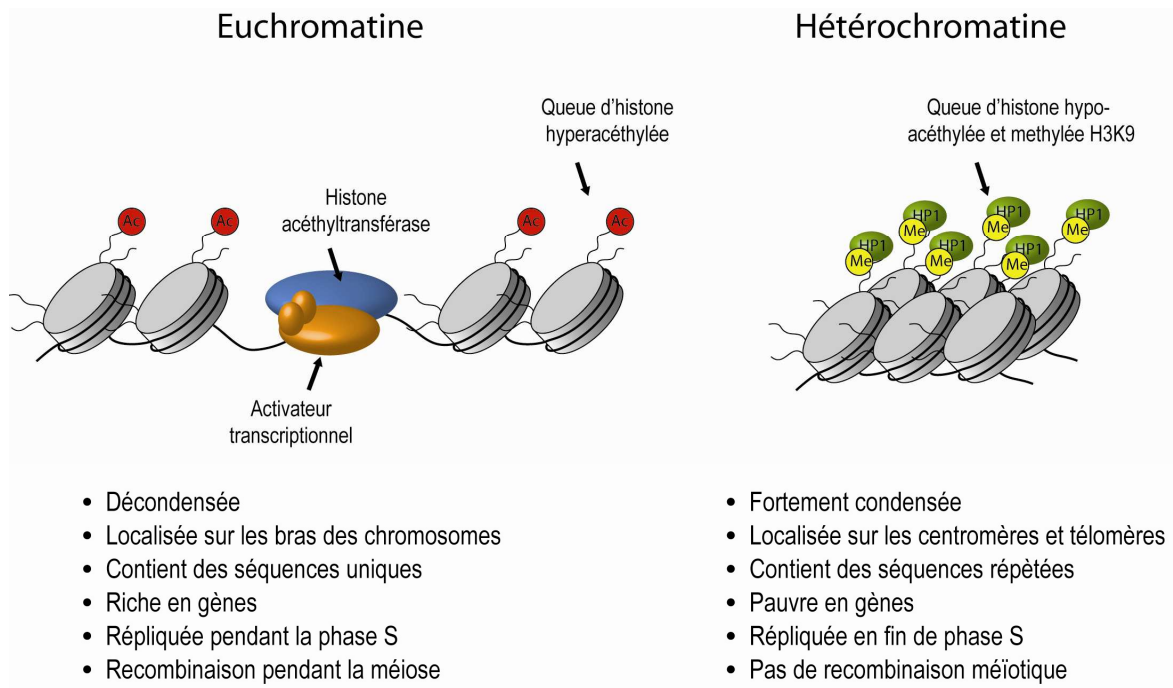


### 3.4. Territoires chromatinien

La chromatine est organisée en régions plus ou moins condensées, appelées territoires chromatinien qui interviennent dans l'expression des gènes et la stabilité des chromosomes. Depuis l'analyse cytologique de mousses par Heitz (1928), deux états structuraux et fonctionnels de la chromatine sont définis : l'hétérochromatine, pauvre en gènes mais riche en séquences répétées et l'euchromatine, riche en gènes (Figure 15 ; Grewal and Elgin, 2007). Trois caractères principaux sont responsables de la distinction entre hétérochromatine et euchromatine : (1) la richesse en adénosine et thymine au niveau des promoteurs, (2) la nature de l'ARN produit après transcription, c'est-à-dire ARN messenger fonctionnel ou ARN non codant et (3) l'organisation du nucléosome qui intervient dans la maintenance de la configuration de la chromatine.

#### **3.4.1 L'euchromatine**

L'euchromatine, répartie à l'intérieur du nucléoplasme, correspond à l'état de la chromatine décondensée pendant l'interphase. Elle permet la transcription de la séquence d'ADN en ARN fonctionnel. Les facteurs de transcription seuls ne suffisent pas pour l'activation de gènes. La décondensation de la chromatine est nécessaire pour permettre l'intervention de complexes de remodelage des nucléosomes, lesquels facilitent l'accès et la stabilité de fixation de la machinerie transcriptionnelle à la matrice ADN (Figure 15 ; Grewal et Elgin, 2007). L'euchromatine se compacte lors des divisions cellulaires, coïncidant avec l'arrêt de la synthèse des ARNm pendant la mitose.



**Figure 15.** Synthèse des propriétés des régions euchromatiques et hétérochromatiques. L'euchromatine décondensée est riche en gènes et permissive à la transcription. L'hétérochromatine, condensée est pauvre en gènes et réfractaire à la transcription (d'après Grewal et Elgin, 2007).

### 3.4.2 L'hétérochromatine

#### 3.4.2.1 Propriétés

L'hétérochromatine est la chromatine qui reste à l'état condensé tout au long du cycle cellulaire (Figure 15). Elle est localisée principalement en périphérie du noyau et du nucléole. Elle est réfractaire à la transcription, à la recombinaison et à la réparation. Cependant sa formation nécessite une transcription à faible niveau (Grewal et Elgin, 2007). En outre, l'hétérochromatine participe à la réplication et la ségrégation des chromosomes (Nagaki *et al.*, 2004). Contrairement à l'euchromatine, l'hétérochromatine est dépourvue d'histones acétylées (Jeppesen et Turner, 1993). D'autres études montrent que l'hétérochromatine possède un fort taux de méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 chez la levure (*Schizosaccharomyces pombe*), les mammifères et les plantes (Litt et coll., 2001 ; Taverna *et*

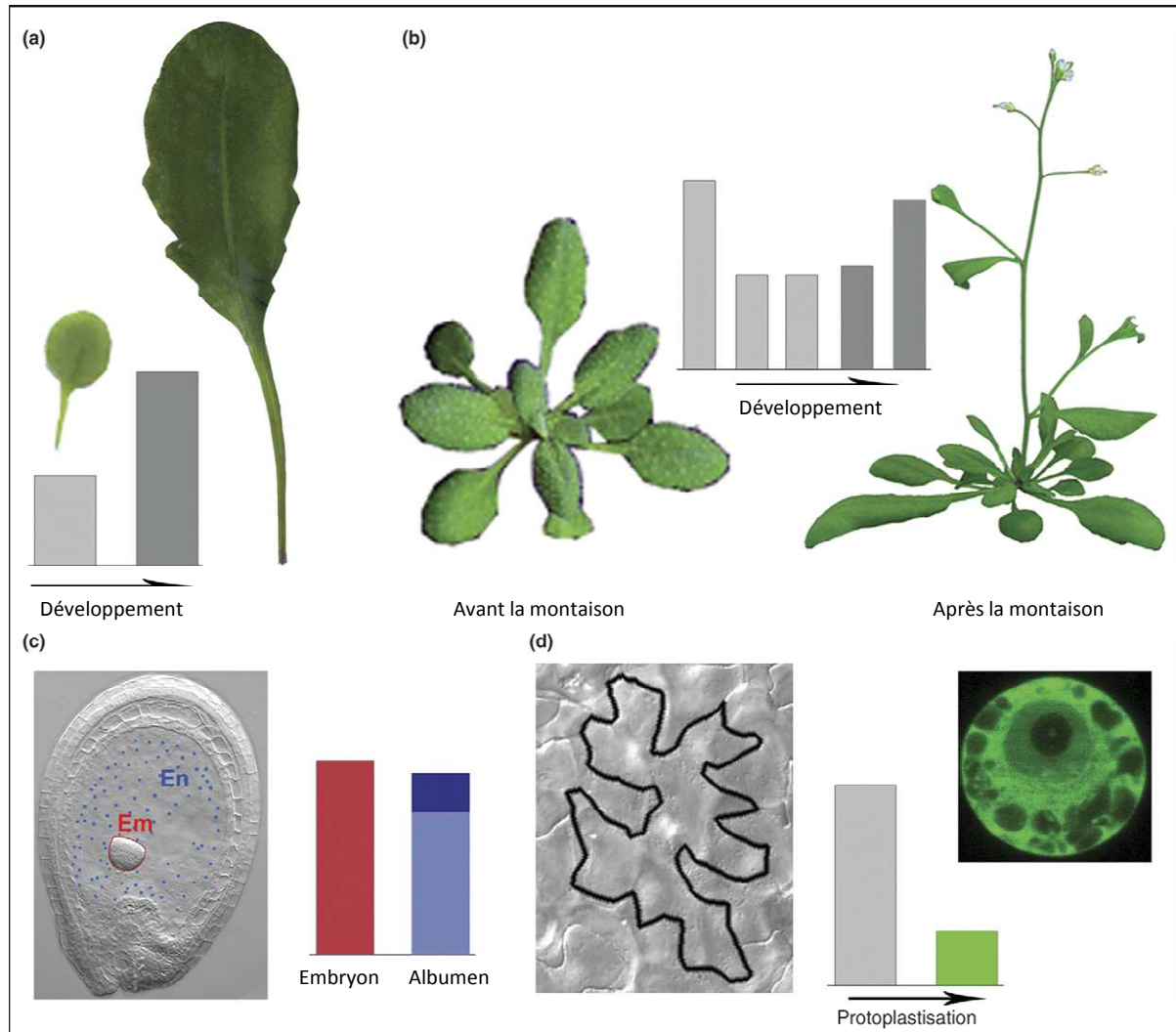
*al.*, 2002 ; Grewal et Elgin, 2007). Une dynamique de l'hétérochromatine a été mise en évidence tout au long du développement d'*Arabidopsis* (Figure 16 ; Exner et Henning, 2008).

#### 3.4.2.2 *L'hétérochromatine constitutive*

L'hétérochromatine est qualifiée de "constitutive" lorsqu'elle est permanente, c'est-à-dire qu'elle correspond à un état stable et irréversible de la chromatine transmis entre chaque division cellulaire. Cette hétérochromatine est très riche en séquences hautement et moyennement répétées du génome et contient très peu de gènes. Elle est principalement localisée au niveau des centromères et des régions péri-centromériques, des télomères et des organisateurs nucléolaires (Grewal et Elgin, 2007). Elle permet ainsi le maintien de la structure du chromosome (régions péri-centromériques) et protège les télomères contre leur dégradation (Garcia *et al.*, 2004).

#### 3.4.2.3 *L'hétérochromatine facultative*

L'hétérochromatine "facultative" se localise au niveau des régions codantes. Elle correspond aux domaines chromatiniens capables d'adopter, de façon réversible, les caractères structuraux et fonctionnels de l'hétérochromatine constitutive. Cela est rendu possible lors de stades particuliers de développement ou au sein de tissus spécifiques. On peut citer par exemple l'inactivation du chromosome X comme un processus épigénétique aboutissant à la répression d'un chromosome entier par la formation d'hétérochromatine facultative.



**Figure 16.** Dynamique de l'hétérochromatine au cours du développement chez *Arabidopsis*. Les barres verticales représentent les fractions d'hétérochromatine. a, L'hétérochromatine s'établit pendant le développement des feuilles : les noyaux des vieilles feuilles contiennent plus d'hétérochromatine (barre gris foncé) que ceux des feuilles jeunes (barre gris clair) ; b, La quantité d'hétérochromatine décroît dans le temps au cours de la transition entre le stade végétatif (barre gris clair) et le stade floral (barre gris foncé) ; c, Les noyaux présents dans l'albumen possèdent moins de chromatine centromérique (barre bleu-clair) que les noyaux présents dans l'embryon (barre rouge), mais contiennent de l'hétérochromatine (barre bleue foncée) absente dans les noyaux des cellules embryonnaires ; d, La fraction d'hétérochromatine des cellules différenciées (barre gris) diminue quand les protoplastes (barre verte) sont formés (Exner and Henning, 2008).

### 3.5. Assemblage et remodelage de la chromatine

#### **3.5.1. Les différentes étapes de l'assemblage de la chromatine**

L'assemblage de la chromatine s'opère principalement lors de la réplication. Il débute par l'association avec l'ADN d'un tétramère d'histones (H3-H4)<sub>x2</sub> sur lequel viennent se fixer successivement deux dimères H2A-H2B pour former le cœur du nucléosome (Worcel *et al.*, 1978 ; Almouzni *et al.*, 1990 ; Smith et Stillman, 1991). L'obtention d'un espacement régulier entre les nucléosomes nécessite la présence d'ATP. Vient ensuite l'incorporation des histones internucléosomales (H1) et le repliement du nucléofilament. D'autres repliements successifs du nucléofilament conduiront à l'architecture en domaines chromosomiques dans le noyau. Le transfert d'histones sur l'ADN est réalisé par des protéines chaperonnes (Henikoff et Ahmad, 2005), telles que la nucléoplasmine, les Nucleosome Assembly Proteins (NAPs), CAF1, etc... Par exemple, les NAPs assemblent les dimères H2A-H2B lors de la réplication.

#### **3.5.2 Les facteurs de remodelage du nucléosome**

Les facteurs de remodelage du nucléosome, présents chez tous les eucaryotes, interviennent dans plusieurs mécanismes : la mobilisation des nucléosomes le long de la fibre de chromatine, la régulation de la transcription, la réparation de l'ADN et l'assemblage de la chromatine (Lusser et Kadonaga, 2003). Il existe globalement deux classes de régulateurs de la structure de la chromatine (Tableau 1 ; Wagner, 2003). Les premiers agissent sur des régions chromosomiques de plusieurs kb et induisent un état silencieux de la chromatine. Les autres agissent localement sur quelques nucléosomes d'une zone promotrice de moins d'un kb et induisent un état réversible d'activation ou de répression transcriptionnelle. Ils sont recrutés par des facteurs de transcription et/ou interagissent avec divers facteurs régulateurs voire même directement avec la machinerie de la transcription (Wagner, 2003). Ces deux types de régulateurs correspondent à des protéines avec des activités diverses qui peuvent interagir entre elles (assemblage, positionnement ou remodelage des nucléosomes, modifications post-traductionnelles des histones et méthylation de l'ADN) (Tableau 1 ; Wagner, 2003). Récemment, quatre groupes fonctionnels ont été établis (Reyes, 2006) : les enzymes de (dé)méthylation de l'ADN, les chaperones d'histones, les enzymes de modification des histones et les enzymes de remodelage de la chromatine ATP-dépendantes.

**Tableau 1.** Liste des complexes et facteurs qui sont impliqués dans la régulation de la structure de la chromatine chez les animaux et les plantes (d'après Wagner, 2003).

Plant chromatin-remodeling and DNA-methylation mutants grouped on the basis of the activity of their metazoan counterparts.					
Complex metazoan homolog	Central subunit (biochemical activity)	Effect on chromatin	Chromosomal region modified	Effect on transcription	Plant factor
<b>Chromatin assembly</b>					
CAF1		Histone deposition	Global		FAS1, FAS2
Asf1	TSL-like (kinase)	Histone deposition	Global		TSL?
<b>Chromatin remodeling and modifying complexes that are involved in transcriptional regulation and transcriptional memory</b>					
<i>Factors that influence nucleosome position/conformation</i>					
Snf2/Brm	SWI/SNF (ATPase)	Stable alteration of nucleosome position and nucleosome conformation	Local/promoter	Activation or repression	SYD
ISWI SWR1/Domino	SWI/SNF (ATPase)	Alteration of nucleosome position, reprogramming?	Global?	Activation or repression	atISWI*
<i>Factors involved in chromatin modification</i>					
Histone acetylation: nuclear (type A) HATs					
GNAT family	Gcn5 (HAT)	Histone acetylation	Local	Activation	AtGCN5
p300/CBP	p300/CBP (HAT)	Histone acetylation	Local	Activation	PCAT2
Histone deacetylation (HDACs)					
NurD	RPD3 (HDAC)	Histone deacetylation	Global?	Repression	HD1; HDA6
NurD	Mi-2 (ATPase)		Global?	Repression?	PKL
-	-	Histone deacetylation		Repression	HD2 (HDAC)
<b>Polycomb group factors</b>					
E(z)/Esc complex	RPD3 (HDAC)	Histone deacetylation	Mostly local	Repression	(Above)
E(z)/Esc complex	E(z), Esc	Targeting of repressive complex?		Repression	CLF, MEA, FIE
Su(z)12				Repression	FIS2, VRN2, EMF2
<b>Factors involved in silencing and heterochromatin formation</b>					
Histone methylation					
Su(var)3-9	Su(var)3-9 (HMT)	Histone methylation	Global	Repression	KYP
DNA methylation					
-	-	Maintenance of CpNpG DNA methylation	Global	Repression	CMT3 (DNMT)
	Dnmt1 (DNMT)	Maintenance of CpG DNA methylation	Global	Repression	MET1, DDM2
	Dnmt3 (DNMT)	<i>De novo</i> DNA methylation	Global	Repression	DRM1, DRM2
	Lsh (SWI/SNF ATPase)	DNA methylation	Global	Repression	DDM1
-	-	Transgene silencing	Global	Repression	MOM1 (SWI/SNF ATPase)
Heterochromatin					
HP1		Condensation, coating	Global	Repression	LHP1, TFL2

\* YS Noh, R Amasino, personal communication.

Le remodelage de la chromatine est dû à l'action de complexes de remodelage ATP-dépendants. Ces complexes modifient la position et/ou la conformation des nucléosomes (Meyer, 2001). La famille des complexes SWI (SWItching mating type )/SNF (Sucrose Non-Fermenting) est l'une des mieux étudiée. Elle a été identifiée grâce à l'analyse de deux types de mutants de levure, l'un présentant une capacité réduite à croître sur un milieu contenant du saccharose (mutants SNF) et l'autre présentant un type de reproduction aberrante (mutants SWI) (Verbsky et Richards, 2001; Narlikar *et al.*, 2002). Ces machineries de remodelage ATP-dépendantes sont des complexes multiprotéiques (Varga-Weisz et Becker, 1998). Les gènes responsables de ces deux différents phénotypes sont désormais appelés gènes SWI/SNF (switch-sniff). Il a aussi été montré que le remodelage de la chromatine favorisait autant

l'activation que la répression de l'activité transcriptionnelle (Holstege *et al.*, 1998). Cette étude est en faveur d'un modèle dans lequel un petit nombre de complexes cellulaires SWI/SNF est recruté vers quelques promoteurs spécifiques. Ceux-ci, en retour, lieront soit des activateurs, soit des répresseurs transcriptionnels.

Chez les animaux, l'inactivation génique chromatine-dépendante est un mécanisme commun qui assure le maintien de la différenciation cellulaire. Chez *Drosophila*, un grand nombre de gènes, collectivement appelés groupe Polycomb (Pc), régule l'accessibilité de régions chromosomales et en conséquence, répriment transcriptionnellement l'expression de gènes de régions chromosomiques particulières (Levine *et al.*, 2004). Chez les végétaux, des gènes ressemblant aux Pc ont aussi été décrits (Wagner, 2003). L'un d'entre eux est le gène CURLY LEAF (CLF) d'*Arabidopsis* (Mayama *et al.*, 2003 ; Chanvivattana *et al.*, 2004 ; Katz *et al.*, 2004). Il n'existe aucun lien entre l'inactivation de la chromatine régulée par Pc et la régulation méthylation-dépendante de l'expression des gènes chez les animaux. Toutefois, deux observations suggèrent l'existence d'une telle connexion chez les plantes (Finnegan *et al.*, 1996). Tout d'abord, les plantes contenant une construction antisens d'une ADN méthyltransférase d'*Arabidopsis*, MET1, présentent un phénotype qui ressemble à celui des mutants *clf* (feuilles gaufrées). De plus, deux gènes homéotiques floraux, APETALA3 (AP3) et AGAMOUS (AG) dont l'expression est réprimée par CLF, sont exprimés de façon ectopique dans ces plantes transgéniques.

### 3.6. Les principaux mécanismes modifiant la nature de l'ADN et des histones

Dès les premières étapes de l'assemblage de la chromatine, la structure initiale peut être soumise à des modifications moléculaires rapides et souvent réversibles au niveau de l'ADN ou au niveau des histones qui peuvent soit présenter différentes modifications post-traductionnelles, soit exister sous des formes variantes. Toutes ces variations sont capables d'induire des différences dans la structure et dans l'activité de la chromatine selon trois modalités (Tableau 2 ; Allis *et al.*, 2007b ; Pfluger et Wagner, 2007). Tout d'abord, de façon *cis*, en modifiant les interactions histone-histone ou histone-ADN. Ensuite, de façon *trans*, en permettant le recrutement de protéines. La méthylation des résidus cytosines de l'ADN permet notamment le recrutement de "Methyl-Binding Proteins" (MBP) qui interagissent avec plusieurs complexes enzymatiques comme les histones désacétylases pour entraîner la formation d'hétérochromatine grâce au recrutement de complexes de remodelage de la

chromatine (Hung et Shen, 2003). Ces complexes enzymatiques sont ATP-dépendants et modifient la chromatine et la composition des nucléosomes de façon non covalente. Enfin, les histones peuvent être remplacées par d'autres histones dites "variantes" (Schwartz et Ahmad, 2005). Chaque histone possède une (ou des) variante(s) particulière(s) présentant des affinités de liaisons et des possibilités de modifications post-traductionnelles propres (Allis *et al.*, 2007a).

**Tableau 2.** Modifications de la chromatine régulant l'expression des gènes (Pfluger et Wagner, 2007).

Types of chromatin alterations that regulate gene expression				
Chromatin alteration <sup>a</sup>	Subtype	Acts upon	Mechanism	Outcome for transcription
Histone modifications	Ubiquitination	Lysine (K)	Distances histones from DNA (bulky moiety)	Activation (H2B) or repression (H2A) <sup>b</sup>
	Methylation	Lysine, arginine (R)	Recruitment of other chromatin regulators	Activation (H3K4, H3K36 <sup>c</sup> ) or repression (H3K9 <sup>c</sup> , H3K27, H4K20, H4R3)
	Acetylation	Lysine	Charge neutralization <sup>d</sup> , recruitment of other chromatin regulators	Activation
	Phosphorylation	Serine (S), threonine (T)	Charge neutralization <sup>d</sup> , recruitment of other chromatin regulators	Activation
Chromatin <sup>e</sup> remodelling	SWI/SNF	Nucleosome position and occupancy	Sliding to new position, histone octamer eviction <sup>b</sup>	Activation and repression
	SWR1	Histone exchange	H2A.Z histone variant incorporation	Activation
DNA methylation	CG and non-CG	Promoter	Inhibition of transcription factor binding	Repression
	CG	Gene (less at 5' and 3' ends)	May reduce transcription elongation	Repression

<sup>a</sup> These and additional chromatin alterations also play a role in heterochromatic silencing of repetitive DNA and transposons, genome integrity, and chromosome stability, which is reviewed elsewhere  
<sup>b</sup> Not yet demonstrated for plants.  
<sup>c</sup> May activate transcription when localized in transcribed region, but repress transcription when localized in the promoter region.  
<sup>d</sup> Charge neutralization decreases the affinity of positively charged histones for negatively charged DNA.  
<sup>e</sup> For simplicity, only a subset of the chromatin remodeling complexes that regulate transcription are listed here.

### 3.6.1 La méthylation de l'ADN

#### 3.6.1.1 Définition

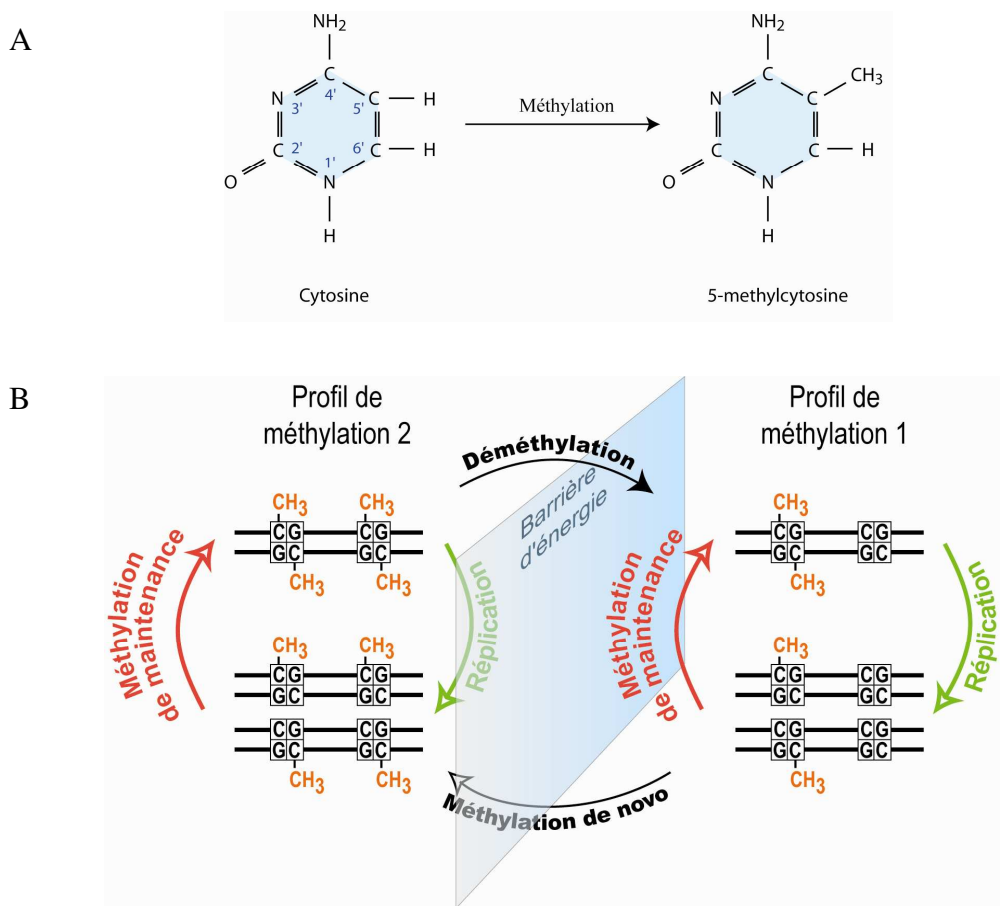
Chez les Eucaryotes, la méthylation de l'ADN, modification covalente, consiste en l'addition d'un groupement méthyle (-CH<sub>3</sub>) provenant de la S-adénosyl-L-méthionine à un résidu cytosine (Figure 17A). Chez les animaux, la méthylation de l'ADN n'affecte que les sites CG (Bird, 2002).

En revanche, chez les plantes, cet ajout s'effectue au niveau de séquences CG, CNG (où N représente A, T, C ou G) ou CHH asymétriques (où H peut être A, T ou C) (Figure 18 ; Turner, 2001 ; Pavlopoulou et Kossida, 2007). Les dinucléotides CG ne sont pas distribués de manière homogène dans le génome mais se situent préférentiellement au sein de séquences



répétitives et dans des blocs de séquences riches en CG dispersés dans tout le génome appelés îlots CpG (Ng et Bird, 1999 ; Frühwald et Plass, 2002). Chez les animaux, ces îlots CpG ont été définis comme “des fenêtres de séquences génomiques de 200 pb avec un contenu G et C d’au moins 55% et une fréquence de dinucléotides CpG supérieure à 0,65” (Costello et al., 2002).

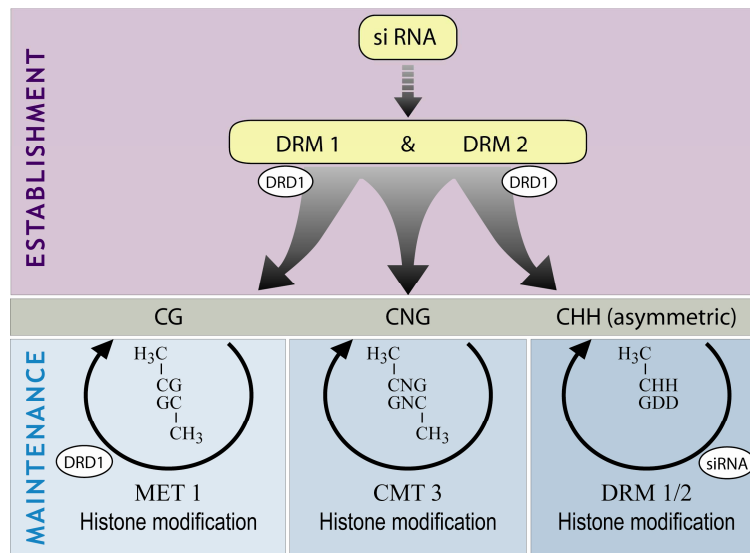
Le profil de méthylation de l’ADN est stable et transmissible par mitose et parfois par méiose (Holliday, 1990). Ce dernier point a été démontré chez les plantes par des expériences sur des mutants d’ADN méthyltransférases (DNMT) chez *Arabidopsis* (Mathieu *et al.*, 2007). En effet, la perte de la méthylation CG entraîne des dérégulations épigénétiques, génétiques et phénotypiques graduelles dans les générations successives. De plus, des cas de transmission méiotique de l’état de méthylation ont été décrits chez les plantes et en particulier lors de la formation des graines (Kinoshita *et al.*, 2007).



**Figure 17.** La méthylation de l’ADN. A : les ADN méthyltransférases transfèrent un groupement méthyle de la S-adenosyl-méthionine sur le carbone 5 de la cytosine (Turner, 2001). B : schéma illustrant la méthylation de maintenance (Dnmt1), la méthylation *de novo* (Dnmt3a et b) et la déméthylation de l’ADN (modifié d’après Buchanan *et al.*, 2000).

### 3.6.1.2 Les classes d'ADN méthyltransférases

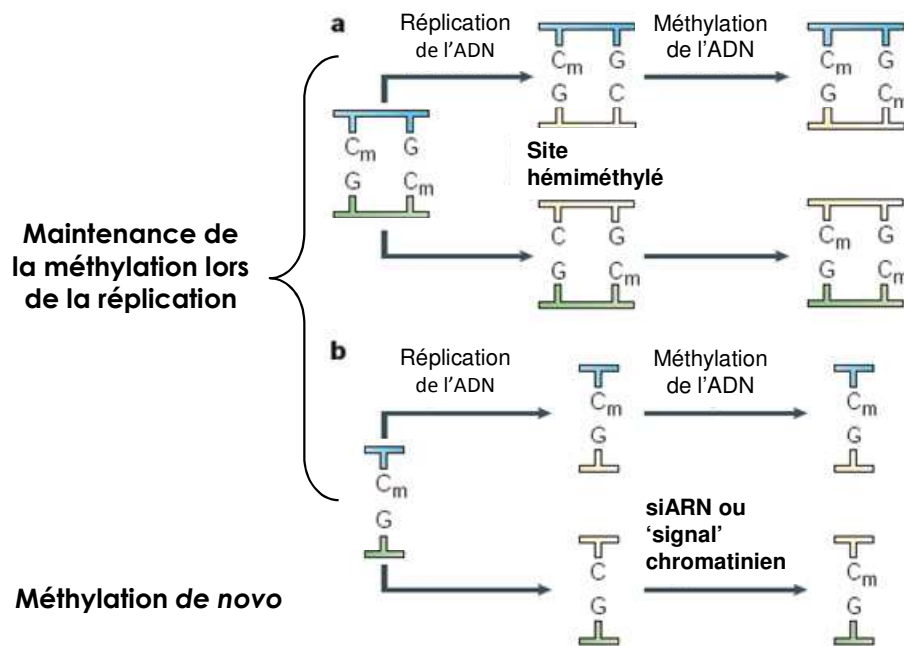
La méthylation de l'ADN est rendue possible grâce à la catalyse réalisée par un groupe conservé de protéines : les ADN méthyltransférases (Figure 18 ; Gruenbaum *et al.*, 1981 ; Clark *et al.*, 1995 ; Finnegan et Kovac, 2000 ; Pavlopoulou et Kossida, 2007). Chez les Eucaryotes, trois types de d'ADN méthyltransférases, Dnmt1, Dnmt3a et Dnmt3b agissent de façon coordonnée pour réguler la méthylation du génome (Bestor, 2000). Chez les plantes, ces enzymes sont nommées différemment : MET1 (méthyltransférase 1), DRM1/2 ('Domains Rearranged Methyltransferases' 1/2) et CMT3 (chromométhyltransférase 3). MET1 est spécifique des sites CG, CMT3 des sites CNG et DRM1/2 des sites asymétriques CHH (Figures 18 et 19 ; Chan *et al.*, 2005).



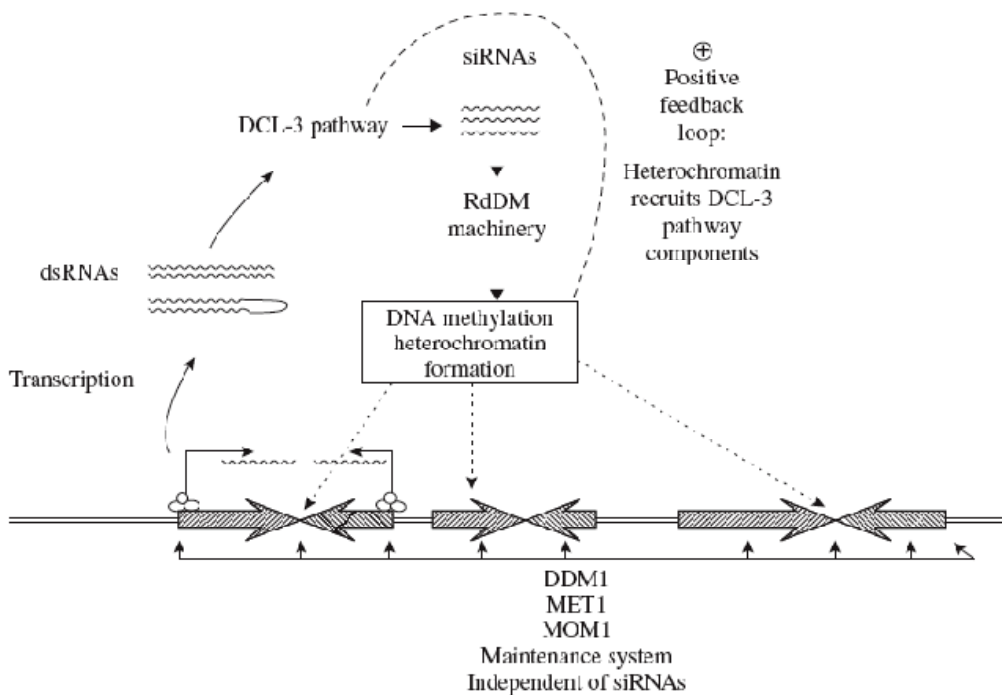
**Figure 18.** Etablissement et maintenance de la méthylation chez *Arabidopsis* (figure originale de l'auteur).

La méthylation de maintenance intervient après la réplication de l'ADN sur le brin néosynthétisé en incorporant des groupements méthyles de façon symétrique au brin parental méthylé. Elle perpétue le profil de méthylation de l'ADN au cours de la réplication.

La méthylation *de novo* correspond à la méthylation de séquences d'ADN antérieurement non-méthylées et l'ajout des groupements méthyles sur de nouveaux résidus cytosine s'effectue en dehors de la phase de réplication (Matzke et Schied, 2007). Elle permet la transmission du profil de méthylation entre les divisions cellulaires. Pour reconnaître les séquences à méthyler *de novo*, la protéine DNMT3L 'scanne' le génome pour identifier et se fixer à des séquences fortement répétées et non méthylées sur leurs histones H3. Elle forme alors un complexe avec la DNMT3a qui est capable de méthyler les cytosines en CG espacées de 8 à 10 nucléotides (Jia *et al.*, 2007).



**Figure 19.** Mécanismes de la méthylation de maintenance et *de novo* de l'ADN. a, Maintien de la méthylation de l'ADN au niveau de cytosine dans un contexte symétrique CG, faisant uniquement intervenir une méthylation de maintenance réalisée par MET1/DNMT1 ; b, Maintien de la méthylation de l'ADN au niveau cytosine dans un contexte asymétrique CHH faisant intervenir de la méthylation de maintenance et de la méthylation *de novo* (Chan et al., 2005).

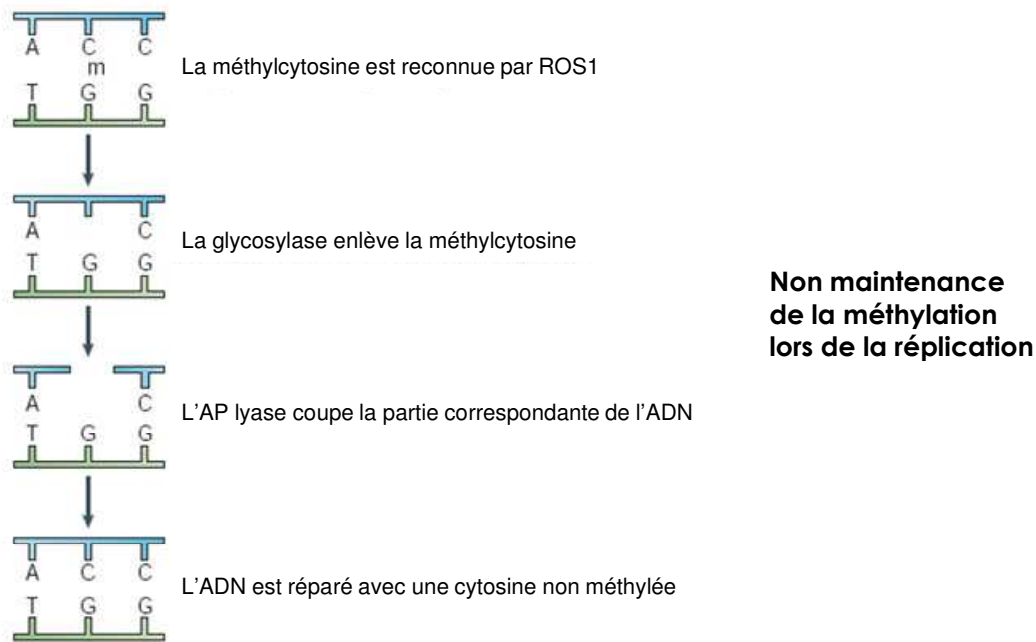


**Figure 20.** Voie "RNA directed DNA methylation" (RdDM) pour l'hétérochromatisation chez les plantes (Grant-Downton et Dickinson, 2005).

Pour initier la méthylation *de novo* et induire une hétérochromatisation (Figure 20), il existe une voie appelée “RNA directed DNA methylation” (RdDM) (Chan et al., 2005 ; Wassenegger, 2005 ; Matzke et Schied, 2007). Cette voie est essentiellement dépendante des DRM1/2 et d’une ARN polymérase IV (spécifique des plantes) qui génèrent des “short interfering RNAs” (siRNA) par la transcription des gènes cibles (contenant des séquences répétées) de cette voie d’hétérochromatisation. Ces petits ARNs servent alors de matrice pour une ARN polymérase ARN dépendante (nommée RDR2) pour fabriquer des ARNs double brins. Ceux-ci sont alors coupés par une enzyme nucléaire (DICER LIKE3) pour produire des siRNAs de 24 nucléotides dits “hétérochromatiques”. Ces siRNAs guident la machinerie protéique RdDM, probablement par le biais d’interaction ARN-ADN, à induire la méthylation *de novo* de l’ADN et des modifications des histones au niveau de toute séquence homologue. Ces modifications entraîneront l’hétérochromatisation de ce locus.

### 3.6.1.3. La déméthylation

La déméthylation, ou la perte de la méthylation de l’ADN, peut se produire de façon passive, c’est-à-dire en l’absence du maintien de la méthylation après la division cellulaire, induisant ainsi une “dilution” des séquences méthylées au sein du tissu (Figures 19 et 21). Elle peut également être réalisée de façon active par des systèmes enzymatiques et avoir lieu dans des cellules qui ne sont pas en division (Ortega-Galisteo *et al.*, 2008). Les enzymes impliquées sont des ADN glycosylases/lyases qui effectuent une excision puis un remplacement de base et la réparation de l’ADN (Figure 21). Plusieurs protéines ont été caractérisées chez les plantes, telles que REPRESSOR OF SILENCING 1 (ROS1) and DEMETER (DME). Ces enzymes ne sont pas uniquement dédiées à la déméthylation de l’ADN mais jouent également un rôle actif dans la régulation de la transcription (Penterman *et al.*, 2007).



**Figure 21.** Les deux voies de déméthylation et le mécanisme catalysé par les ADN glycosylase-lyases (Chan *et al.*, 2005).

### 3.6.2. Les modifications post-traductionnelles des histones

Les protéines histones possèdent des extrémités N-terminales qui sortent du cœur du nucléosome et qui sont susceptibles de subir des modifications post-traductionnelles comme l'acétylation ou la méthylation (Figure 22 ; Khorasanizadeh 2004 ; Turner 2005 ; Allis *et al.*, 2007a). Ces modifications, qui sont covalentes et réversibles, peuvent être reconnues de manière spécifique par certaines protéines et sont à l'origine du recrutement de complexes spécifiques sur la chromatine. Ces modifications post-traductionnelles ont donc un impact important sur la régulation de la structure chromatinienne et l'expression des gènes (Tableau 3).

**Tableau 3.** Les modifications d'histones et leur impact sur la transcription chez *Arabidopsis* (Pfluger et Wagner, 2007).

Histone modifications in <i>Arabidopsis</i>					
Modification	Location	Effect	Transcription	Established by	Removed by
Ubiquitination H2BK143ub1	Eu-chromatin	Open	Activation	Ring-type E3 ligases <b>HUB1, HUB2</b> [52*,53*]	Deubiquitinases <b>SUP32/UBP26</b> [54**]
Methylation H3K4me*	Eu-chromatin	Open	Activation	trxG class of histone methyltransferases (HMTs) [55]	LSD1-type of histone demethylases (HDMs) [3,8], <b>FLD</b> [28]
H3K4me1	Eu-chromatin	Open	Activation intron <sup>a</sup> [38*]	<b>ATX1</b> [56]	
H3K4me2	Eu-chromatin	Open	Activation proximal promoter [55]; 5' end gene [57]	<b>ATX1</b> [56], <b>EFS/SDG8</b> [57]	
H3K4me3	Eu-chromatin	Open	Activation proximal promoter [55]; 5' end gene [57]		
H3K9me*	Both	Closed	Repression	Su(var) class of HMTs [55]	JmjC-domain and LSD1-type HDMs [3,8]
H3K9me1	Hetero-chromatin	Closed	Repression	<b>SUVH2</b> [58], <b>SUVH4</b> , <b>SUVH6</b> [59], <b>SUVH5</b> [60]	
H3K9me2	Hetero-chromatin	Closed	Repression	<b>SUVH2</b> [58], <b>SUVH4</b> , <b>SUVH6</b> [59], <b>SUVR4</b> [61]	
H3K9me3	Eu-chromatin	Closed	Repression proximal promoter, 5' end gene, gene [11**]		
H3K27me*	Both	Closed	Repression	E(Z) class of HMTs (PRC2 complex) [55]	
H3K27me1	Hetero-chromatin	Closed	Repression		
H3K27me2	Hetero-chromatin	Closed	Repression		
H3K27me3	Eu-chromatin	Closed	Repression promoter, 5' end gene, gene [11**,12,13]	<b>CLF, SWN, MEA</b> [12,13]	
H3K36me*	Eu-chromatin	Open	Activation	Set domain HMTs	JmjC-domain HDMs. Possibly <b>REF6</b> [28,62]
H3K36me1	Eu-chromatin	Open	Activation intron <sup>a</sup> [63]	<b>EFS/SDG8</b> [63]	
H3K36me2	Both	Open	Activation intron <sup>a</sup> [63]		
H3K36me3	Eu-chromatin	Open	Activation intron <sup>a</sup> [63]		
H4K20me*	Both	Closed	Repression		JmjC domain HDMs
H4K20me1	Hetero-chromatin	Closed	Repression	<b>SUVH2</b> [58]	
H4K20me2	Eu-chromatin	Closed	Repression		
H4K20me3	Eu-chromatin	Closed	Repression		
H4R3sme2	Eu-chromatin	Closed	Repression promoter [64*]	Arginine methyltransferases, <b>SKB1/AtPRMT5</b> [64*,65]	Deimination [8]
Acetylation H3K*ac/H4K*ac	Both	Open	Activation promoter, 5' end gene [33**,38*,66]	Histone acetyltransferases (HATs) [25], GNAT family: <b>GCN5/HAG1</b> [30,34,42**], CBP/p300 family: <b>HAG1, HAC5, HAC12</b> [26,67,68], TAFII family: <b>HAF2/TAF1</b> [30]	Histone deacetylases (HDACs) [25], RDP3 family: <b>HDA19</b> [27,30,37,42**,69], <b>HDA6</b> [70], HDA1 family: <b>HDA18</b> [71], HD2 family: <b>HD2A, HD2B</b> [72], <b>HD2C</b> [73]
Phosphorylation <sup>b</sup> H3S10ph, H3S28ph, H2T11ph	Both	Open	Activation	Kinases [74]	Phosphatases [74]

Histone modifications, their locations in the genome and their effects on chromatin (open/closed) as well as on transcription of euchromatic genes are listed. Also listed are the enzymes known to add and remove each modification. Plant histone modifiers are listed in bold type.

\* denotes all modifications of a certain type, for example, H3K9me\* denotes mono, di, and trimethylation of lysine nine in histone H3, while H3\*ac denotes general acetylation of lysines in histone H3.

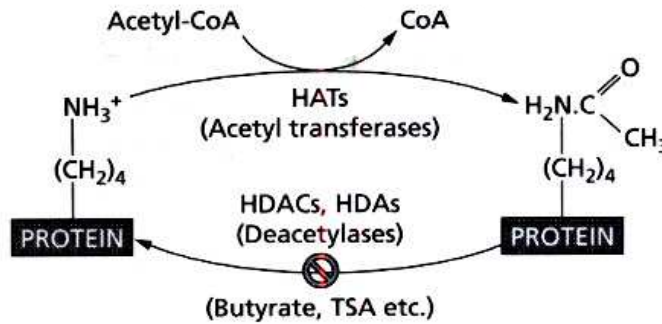
<sup>a</sup> These introns contain *cis* regulatory elements important for transcriptional regulation.

<sup>b</sup> The role of histone phosphorylation in the cell cycle is described elsewhere [24,74].

### 3.6.2.1. L'acétylation des histones

La modification des histones la plus étudiée est l'acétylation des résidus lysines. L'état d'acétylation des histones dépend de l'équilibre entre deux activités antagonistes (Figure 22) : l'activité des histone-acétyltransférases (HAT) et l'activité des histone-désacétylases (HDAC).

Elles forment des complexes HAT et HDAC qui sont recrutés de manière spécifique sur certains promoteurs. D'après des études montrant que les gènes actifs de l'euchromatine sont riches en histones hyperacétylées, l'acétylation des histones a été directement associée à l'activation de la transcription. Des travaux récents montrent que cette modification peut aboutir à la répression d'un même gène.



**Figure 22.** Cycle d'acétylation / désacétylation des histones par les enzymes histone acétyltransférases (HAT) et histone désacétylases (HDAC ; Turner, 2001).

### 3.6.2.2 La méthylation des histones

La méthylation ne modifie pas la charge globale de l'histone et de ce fait constitue une modification plus stable. Elle est assurée par les histones méthyl-transférases (HMT) qui catalysent le transfert des groupements méthyles. Ainsi, les lysines peuvent être mono-, di- ou tri-méthylées en réponse à l'action des lysine-méthyltransférases (HKMT). Les arginines peuvent être mono- et di-méthylées de manière symétrique ou asymétrique suite à l'action des arginine-méthyltransférases (PRMT ; Kouzarides, 2002). Récemment, Klose et Zhang (2007) démontrent l'existence de protéines capables de déméthyliser les histones comme par exemple les protéines à domaine Jumonji C (JmJC). La méthylation des histones est un mécanisme intervenant dans de nombreux processus comme la formation de l'hétérochromatine, le "silencing" transcriptionnel, l'activation transcriptionnelle et la réparation de l'ADN.

### *3.6.2.3 Les autres modifications*

La phosphorylation des résidus sérines des histones, assurée par des couples de kinases-phosphatases, joue un rôle dans la régulation de la transcription, le déroulement de la mitose et la réparation de l'ADN. L'ubiquitination des résidus lysines (mono-ubiquitination) pourrait intervenir dans la répression de la transcription. L'ADP ribosylation est associée à une activation de la transcription. Enfin, d'autres modifications post-traductionnelles des histones comme la biotinylation, la sumoylation et la glycosylation restent encore peu étudiées.

### *3.6.2.4. Mécanismes moléculaires d'interactions entre la méthylation de l'ADN et les modifications des histones*

Dans les cellules animales, il a été montré que les séquences portant des cytosines méthylées attirent des protéines, les "methyl-binding proteins", qui possèdent un domaine de liaison aux parties méthylées (MBD = Methyl Binding Domain) (Ballestar et Wolffe, 2001 ; Watanabe *et al.*, 2003). Cinq facteurs contenant des MBD ont été décrits, MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 et MBD4 (Hark *et al.*, 2000). Trois au moins (MeCP2, MBD2, MBD3) sont associés à de grands complexes protéiques contenant des histones désacétylases (HDAC1 et HDAC2) et présentant des activités de remodelage de la chromatine telles que Sin3a et Mi2 (Wade *et al.*, 1999). En effet, Mi2 est une protéine impliquée dans le remodelage de la chromatine qui appartient à la famille des hélicases nucléaires SWI/SNF (Baylin et Herman, 2000). Des résultats récents montrent également que la voie du facteur répresseur de la transcription E2F-Rb entre en contact avec les facteurs de remodelage de la chromatine. Cette interaction contrôlerait la transcription et la progression dans le cycle cellulaire, à la fois chez les plantes et les animaux (Robertson *et al.*, 2000 ; Shen, 2002).

L'interaction de MBD2 et MBD3 avec DNMT1 a lieu tardivement au cours de la phase S (Tatematsu *et al.*, 2000). Ceci paraît cohérent puisque l'ADN méthylé est répliqué tardivement et que MBD2 et MBD3 sont alors supposés se lier aux parties hémi-méthylées de l'ADN (Dobosy et Selker, 2001). Ces protéines se liant aux cytosines méthylées recrutent alors des histones désacétylases qui enlèvent le groupement acétyle des lysines du côté N-terminal des histones H3 et H4, augmentant ainsi les contacts inter-nucléosomaux. La chromatine qui en résulte est condensée et est moins accessible à la machinerie



transcriptionnelle (Nan *et al.*, 1998). La méthylation de l'ADN a donc une influence directe à la fois sur l'acétylation des histones et sur les structures de la chromatine d'ordre plus élevé (Brown et Strathdee, 2002). Ces résultats associent pour la première fois la désacétylation des histones qui provoque l'inactivation transcriptionnelle de la chromatine à la méthylation de l'ADN.

Les méthyltransférases de l'ADN de mammifères semblent aussi interagir directement avec les HDAC au sein d'un complexe multiprotéique. En effet, les résultats d'expériences *in vitro*, utilisant un système double hybride chez la levure, ont montré que l'HDAC1 et l'HDAC2 interagissent directement avec la DNMT1 (Fuks *et al.*, 2000). Le complexe DNMT1/HDAC pourrait être idéalement positionné pour perpétuer l'état d'inactivation de régions chromosomiques de l'hétérochromatine se répliquant tardivement (Rountree *et al.*, 2000), lesquelles sont caractérisées par des histones hypoacétylées et de l'ADN fortement méthylé (Dobosy et Selker, 2001).

Chez les plantes, des mécanismes similaires semblent exister. En effet, des homologues des facteurs de remodelage de la chromatine, des méthyltransférases de l'ADN et des enzymes modifiant les histones existent et pourraient interagir avec la voie E2F-Rb (Li *et al.*, 2002 ; Shen, 2002). Cependant, les CMT3 ainsi que la famille HD2 des histones désacétylases existent uniquement chez les plantes (Henikoff et Comai, 1998). Leurs rôles précis dans le contrôle épigénétique ne sont actuellement pas encore élucidés. Des corrélations entre l'acétylation des histones, la méthylation de l'ADN et la méthylation des histones ont aussi été mises en évidence. Chez les mammifères et les plantes, l'accumulation des histones H3 méthylées sur la lysine en position 9 (H3K9<sup>me</sup>) et l'hyperméthylation de l'ADN ont été attribuées à de l'hétérochromatine constitutive. L'hypométhylation de l'ADN et la présence de H3 méthylées sur K4 sont considérées, à l'inverse, comme caractéristiques de l'euchromatine (Richards et Elgin, 2002). Divers travaux ont récemment mis en évidence des relations entre les processus de méthylation de l'ADN et des histones (Tamaru et Selker, 2001 ; Jackson *et al.*, 2002 ; Fuks *et al.*, 2003 ; Martin et Zhang, 2005). Des interactions fonctionnelles et physiques entre les méthyltransférases des histones et les histones désacétylases ont aussi été démontrées dans les cellules animales (Vaute *et al.*, 2002).

### *3.6.2.5. L'hypothèse du code histone*

Parmi les différentes modifications présentées ci-dessus, certaines peuvent interférer les unes avec les autres. Chaque combinaison née de cette interférence entraînerait une réponse biologique spécifique suggérant l'existence d'un "code histone" regroupant l'ensemble des combinaisons (Allis *et al.*, 2007a). Selon ce principe, chaque combinaison serait susceptible d'être lue par des protéines spécifiques, et leur interprétation régulerait l'expression des gènes (Turner 2002).

Cependant, une même marque épigénétique est associée à des états chromatiniens différents selon l'organisme, voire l'individu. Ainsi, contrairement au code génétique, le code épigénétique, s'il en existe un, n'est ni universel ni composé de combinaisons simples telles que les codons mais reflète plutôt un ensemble de mécanismes covalents et non covalents aboutissant à un état chromatiniens ou à un autre.

## **3.6.3. Les variants d'histones**

### *3.6.3.1 Généralités*

Par variants d'histones, on qualifie les isoformes non-alléliques des histones conventionnelles (ou histones canoniques) phylogénétiquement stables. Le remplacement d'une histone canonique par un variant d'histone est un important mécanisme épigénétique utilisée par la cellule pour moduler la structure chromatiniens et l'expression des gènes. Au sein du nucléosome, le remplacement d'histones canoniques par des variants d'histones affecte fortement certains processus cellulaires comme la transcription, la réparation de l'ADN, la division cellulaire ou la méiose et a donc d'importantes conséquences phénotypiques. Excepté l'histone H4, toutes les histones possèdent des variants avec lesquels elles sont susceptibles de se substituer (Pandey et Marzluff, 1987). Des chaperonnes spécifiques prennent en charge l'incorporation des variants d'histones dans le nucléosome. Contrairement aux histones canoniques, l'incorporation des variants d'histones n'est pas strictement couplée à la réplication de l'ADN, ceux-ci peuvent être déposés à tout moment du cycle cellulaire.

*3.6.3.2. L'exemple d'un variant centromérique*

Dans le cas de l'histone H3, ces principaux variants (H3.3 et des variants centromériques CenH3) jouent un rôle particulier dans la transcription et la ségrégation des chromosomes (Henikoff et Dalal, 2005). Par exemple, chez les mammifères, l'histone H3 est remplacé par un variant d'histone CenH3 (ou CENP-A) au niveau des centromères (Palmer *et al.*, 1987). Les centromères correspondent aux régions du chromosome où sont assemblés les kinétochores responsables de l'attachement des microtubules, nécessaires pour la ségrégation chromosomique lors de la mitose et de la méiose (Blower et Karpen, 2001). Chez l'homme ou la mouche, la séquence primaire d'ADN n'est pas suffisante pour diriger la formation de centromères fonctionnels mais l'identité du centromère est déterminée épigénétiquement (Karpen et Allshire, 1997). Dans ce cas, ce serait la composition de la chromatine qui dirigerait l'assemblage des kinétochores et la formation du centromère et non pas seulement la séquence d'ADN.

## 4. Objectifs de la thèse

Chez les plantes, les phénomènes épigénétiques sont impliqués non seulement dans le déroulement normal du programme de développement mais également dans la grande plasticité développementale développée en réponse à des variations de leur environnement. En outre, les marques de la chromatine comme la méthylation de l'ADN sont à l'origine d'un polymorphisme supportant l'existence d'épiallèles. Un tel polymorphisme, s'il est héritable, pourrait être exploitable dans l'optique de biomarqueurs pour la sélection assistée en agronomie végétale comme cela est déjà le cas en pathologie humaine (Laird, 2003).

Dans ce contexte, trois objectifs principaux ont guidé ce travail de thèse :

Notre premier objectif a été la mise au point d'une stratégie pour la mise en évidence d'un contrôle épigénétique lors d'un processus développemental chez une plante et la recherche de biomarqueurs épigénétiques. L'application de cette stratégie pour la morphogenèse *in vitro* a été réalisée sur trois lignées cellulaires de betterave sucrière. L'identification de biomarqueurs épigénétiques a alors été abordée par deux approches : une approche gène candidat et une approche de "scanning" du génome. L'ensemble de ces résultats est présenté dans le premier chapitre de ce mémoire.

La stratégie développée a ensuite été appliquée sur un modèle de morphogenèse *in planta* en collaboration avec un partenaire industriel. Ce travail a inclut dans une première phase la mise en évidence de l'existence d'un contrôle épigénétique (et plus particulièrement de la méthylation de l'ADN) lors de la vernalisation et de la dévernalisation chez plusieurs hybrides de betterave sucrière, avec des sensibilités à la montaison différentes. Ces résultats sont présentés dans le deuxième chapitre.

Enfin après avoir démontré l'existence d'un état de méthylation de l'ADN différent entre des hybrides sensibles et résistants à la montaison, notre objectif a alors été de caractériser les loci cibles de ces remaniements de la méthylation de l'ADN lors de la vernalisation. L'identification des telles séquences a été suivie d'un criblage visant à identifier parmi elles de potentiels biomarqueurs épigénétiques de la sensibilité à la montaison en vue de la mise au point d'un test de sélection qui fait actuellement défaut aux améliorateurs. Ce travail constitue la dernière partie de ce mémoire.



# Chapitre 1

Mise au point d'une stratégie pour la recherche et la validation de marqueurs épigénétiques : application à la morphogenèse *in vitro* chez la betterave sucrière

---



# Chapitre 1

## Mise au point d'une stratégie pour la recherche et la validation de marqueurs épigénétiques : application à la morphogenèse *in vitro* chez la betterave sucrière

---

### Introduction

1. La betterave sucrière : la plante modèle
2. Stratégie et méthodes pour l'étude des phénomènes épigénétiques (**Publication n°1**).
3. Compléments pour l'étude des marques épigénétiques à l'échelle du génome : le cas du méthylome de l'ADN.
4. Application à la morphogenèse *in vitro* chez la betterave sucrière (**Publication n°2**).
5. Compléments sur la validation des biomarqueurs épigénétiques dans le cadre de la sélection assistée par marqueurs.

### Conclusions et perspectives

(**Contrat de recherche 222N avec SES-VanderHave et projet de publication n°3**).



## **Introduction**

Suite à la présentation des mécanismes épigénétiques chez les plantes dans l'introduction générale, les objectifs de ce chapitre sont de présenter la stratégie que nous avons utilisée pour mettre en évidence un contrôle épigénétique lors de la morphogenèse *in vitro* chez la betterave sucrière et d'exposer les méthodes correspondantes. Enfin, une utilisation possible du polymorphisme épigénétique (biomarqueurs épigénétiques) sera proposée dans le cadre de la sélection assistée par marqueurs en amélioration végétale.

Ainsi, ce chapitre se compose de cinq parties. La première est une présentation de la plante modèle : la betterave sucrière. La seconde partie est constituée d'un article de revue intitulé « Characterization of epigenetic biomarkers using new molecular approaches » (**Gentil and Maury, 2007 ; publication n°1**) et qui présente la stratégie et les méthodes pour l'étude des phénomènes épigénétiques. Un complément à cet article (troisième partie) est ensuite présenté pour les méthodes récemment utilisées pour la caractérisation des marques épigénétiques à l'échelle du génome complet : le cas du méthylome. La quatrième partie proposera une première application de cette stratégie réalisée au début de ma thèse (suite de la thèse de Mlle Adisa Causevic, 2005) sur trois lignées cellulaires *in vitro* de betterave sucrière permettant une modélisation simple d'un système de morphogenèse végétative. Ce travail sera présenté sous la forme d'une publication intitulée « Relationship between DNA methylation and histone acetylation levels, cell redox and cell differentiation states in sugarbeet lines » (**Causevic/Gentil et al., 2006 ; publication n°2**). La dernière partie apportera des compléments sur la validation de ces marqueurs dans le cadre de la recherche de marqueurs moléculaires de sélection de l'aptitude morphogène *in vitro* chez la betterave sucrière en collaboration avec la société semencière SES-VanderHave (Marc Lefebvre, Steve Barnes, Bert Vandebusch et Guy Weyens ; **projet de publication n°3**).

## 1. La betterave sucrière : la plante modèle

### 1.1. Sa biologie

La betterave à sucre est une plante dicotylédone qui appartient comme l'épinard à la famille des Chénopodiacées. Le genre *Beta* comprend trois espèces dont l'espèce *Beta vulgaris* qui se divise en trois sous-espèces :

- les formes cultivées (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*) : la betterave sucrière (*Altissima* ; Figure 23), la betterave fourragère (*Crassa*) et la betterave potagère (*Conditiva*).
- les formes sauvages (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) rencontrées le long des côtes.
- les betteraves rudérales ou adventices qui vivent essentiellement dans les champs et parfois dans les talus.

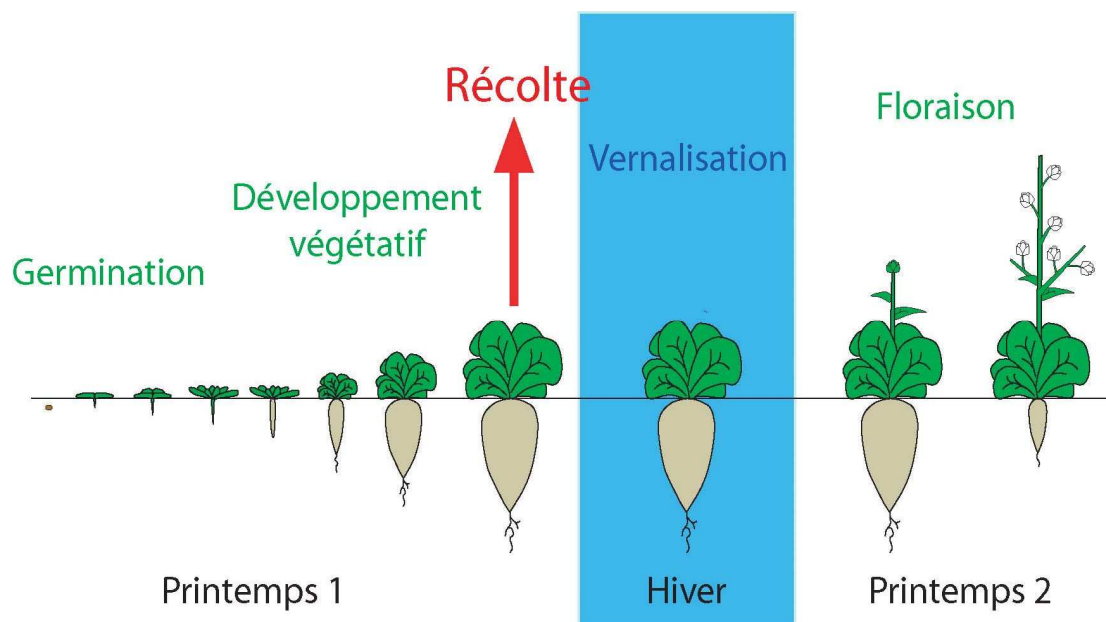


---

**Figure 23.** Photographie d'une betterave sucrière.

La betterave sucrière bisannuelle emmagasine des réserves de saccharose dans sa racine durant la première année de croissance végétative et s'en sert pour passer l'hiver et assurer sa floraison la deuxième année (Figure 24). La racine est presque entièrement enfouie dans le sol et mesure entre 15 et 35 cm de long. Elle est conique, parcourue par deux sillons, et possède un collet plat. Elle peut contenir jusqu'à 20 % de son poids en sucre, stocké principalement dans sa partie la plus renflée. Elle se termine par un pivot, dont le prolongement peut descendre jusqu'à 2 m de profondeur.

La floraison n'intervient qu'après une période hivernale : c'est la vernalisation (Figure 24). Ce phénomène est défini comme l'aptitude à la montaison (production de la tige) ou à la floraison suite à une période de froid. Un tel processus illustre bien la notion de plasticité développementale qui correspond aux variations de forme et de croissance (et donc de morphogenèse) en réponse aux changements de l'environnement (ici le froid hivernal). La transition florale chez la betterave est une modification majeure de la morphologie de la plante accompagnée par une utilisation des sucres accumulés dans la racine, ce qui provoque des pertes importantes de production. La température de 21°C favorise le développement végétatif alors que les températures entre 4 et 10°C favorisent l'initiation de la phase reproductrice. La plante est compétente pour percevoir le signal "froid" dès le stade 4-5 feuilles. La plupart des variétés commerciales nécessite une exposition de 90 à 110 jours à des températures inductrices pour initier le développement reproducteur.



**Figure 24.** Représentation du cycle de la betterave sucrière, du stade de graine au stade floral. La récolte est effectuée lorsque la racine a accumulé une grande quantité de sucre (en novembre) avant la vernalisation due à l'hiver (figure originale de l'auteur).

## 1.2. Sa culture

La betterave sucrière est cultivée dans les régions tempérées, principalement localisées dans l'hémisphère Nord entre le 30° et le 62° parallèles de latitude Nord mais également en Uruguay et au Chili. En France, la culture de la betterave occupe 2,5 % des terres arables. Elle est pratiquée dans 38 départements de la métropole mais elle se situe presque exclusivement au nord de la Loire (Figure 25). Elle est principalement répartie dans le Nord et le Nord-Est du pays, en Ile de France, en Normandie, et dans le Centre. Dans certains départements, la culture de la betterave est limitée à une certaine aire géographique (ex : Côte-d'Or) contrairement à d'autres départements où elle est très largement pratiquée (ex : Aisne ; Figure 25).

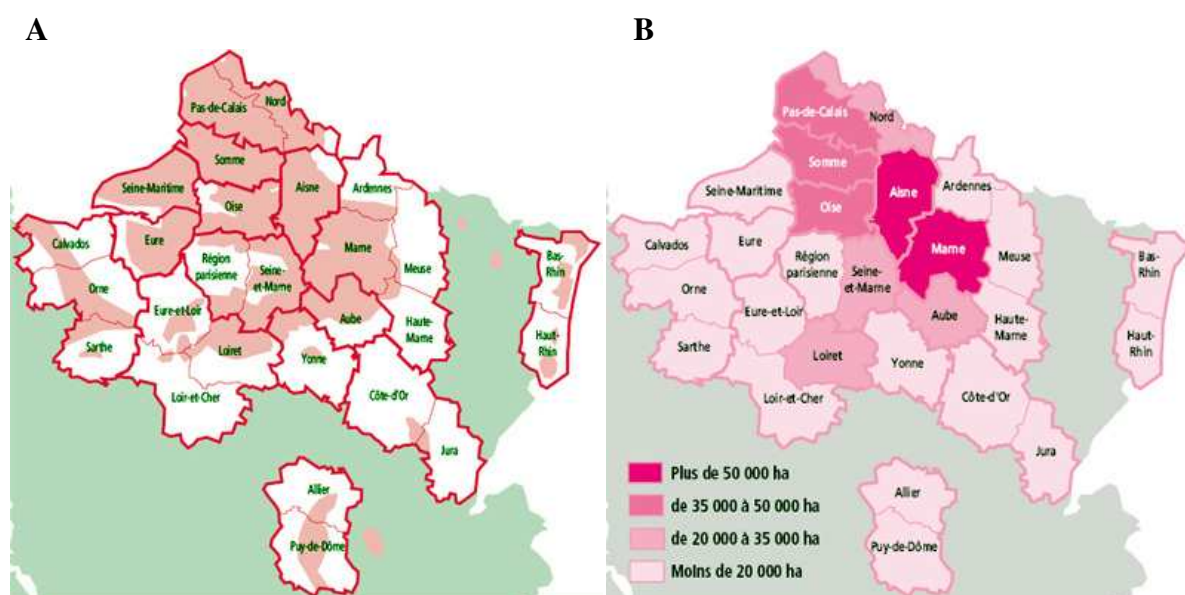


Figure 25. A, Zones de culture betteravière. B, Les départements betteraviers d'après l'état des ensemencements, campagne 2002-2003 ([www.labetterave.com](http://www.labetterave.com)).

### 1.3. Son amélioration et son exploitation

La culture de la betterave sucrière à des fins industrielles démarre au 18<sup>ème</sup> siècle en Allemagne. Sa culture industrielle émerge en France après la révolution et avec le blocus continental institué par Napoléon. Elle connaîtra alors des hauts et des bas jusqu'à ce jour. Après la récolte et la réception dans une sucrerie, les betteraves sont découpées en fines lamelles, puis trempées dans un courant d'eau chaude pour en extraire le sucre, par diffusion. Le jus de diffusion est purifié par un traitement à la chaux et au gaz carbonique qui se termine par une filtration. Le jus épuré contenant 85 % d'eau est concentré en sirop par évaporation. Il est chauffé sous pression réduite puis concentré pour déclencher la cristallisation. La masse cuite produite est envoyée dans des turbines qui évacuent la phase liquide par centrifugation et retiennent le sucre blanc cristallisé. Il est séché, puis stocké afin d'assurer sa commercialisation.

Les variétés de betteraves sucrières cultivées actuellement sont issues de la betterave " blanche de Silésie " sélectionnée à la fin du XVIII<sup>ème</sup> siècle par le chimiste allemand Achard. La betterave sucrière cultivée est une plante domestiquée puis améliorée qui est exploitée industriellement depuis le 19<sup>ème</sup> siècle. Son amélioration progressive lui permet d'accumuler jusqu'à 20 % de saccharose dans sa racine. Elle représente la deuxième source mondiale de sucre. La France est le premier pays producteur de sucre de betterave sucrière avec plus de 30 millions de tonnes par an. Ce secteur correspond à plus de 35 000 producteurs et débouche sur plus de 56 000 emplois directs pour un chiffre d'affaires de 3,2 milliards d'euros/an. Les secteurs concernés sont l'agro-alimentaire (sucre et mélasse), l'industrie chimique (éthanol), l'alimentation animale (pulpe) et les biocarburants (bioéthanol et ETBE).

La Région Centre est une des zones de forte production de sucre (Figure 25). Près de 45 000 ha de betteraves sucrières y sont cultivés par environ 3 000 planteurs (soit 10 % du potentiel français). L'ensemble de cette production alimente 5 sucreries et/ou distilleries. L'extension de la culture de la betterave sucrière pour la production de biocarburants devrait contribuer au développement de cette activité dans la Région. En effet, la France s'est engagée, comme le reste de l'Europe, à développer sa production de carburants d'origine non fossile (renouvelable) et à la porter à 2 % en 2005 et 5,75 % en 2020 (elle est actuellement de moins de 1 %).

De plus, la France est un des deux principaux centres mondiaux pour la production de semences de base et de graines commerciales. La Région Centre, s'impose avec le Sud Ouest (environ 200 ha), pour la production de semences de base, lesquelles sont utilisées pour la production des variétés commerciales. Ces variétés sont des diploïdes ou des hybrides triploïdes. Ces derniers sont obtenus en croisant un parent mâle tétraploïde sur une plante diploïde mâle stérile qui est utilisée comme parent femelle. Les descendants sont généralement doublement stériles (déséquilibre chromosomique et stérilité mâle cytoplasmique). Cependant, quelques descendants produisent un pollen aneuploïde qui donnera des plantes fertiles s'il est utilisé sur des plantes diploïdes mâles stériles.

L'objectif des programmes d'amélioration est ainsi de développer de nouvelles variétés, par le biais de croisements et de la sélection assistée par marqueurs, améliorées pour leur rendement en sucre, leur pourcentage de germination, leur résistance aux maladies et leur tendance à la montaison.



## 2. Stratégie et méthodes pour l'étude des phénomènes épigénétiques (Publication n°1)

Le développement des plantes est caractérisé par une extrême plasticité (Srivastava, 2001) qui implique un changement de forme, de port ou de croissance en réponse à des modifications de l'environnement (Pigliucci, 2001 ; Weigel et Jürgens, 2002). Des phénomènes épigénétiques comme la méthylation de l'ADN sont impliqués à la fois dans le cadre d'un déroulement normal du programme développemental mais également dans le contrôle de cette grande plasticité développementale (Boyko et Kovalchuk, 2007 ; Lukens et Zhan 2007 ; Matzke et Scheid, 2007). L'ensemble des données moléculaires sur la méthylation de l'ADN démontre une grande variabilité du méthylome, c'est-à-dire de l'ensemble des marques de méthylation de l'ADN à l'échelle du génome, ainsi que son rôle important dans le développement des plantes et leurs réponses à l'environnement.

Le polymorphisme de méthylation de l'ADN chez les plantes est ainsi une source possible de marqueurs pour caractériser des stades de développement, sélectionner des plantes selon des caractères agronomiques ou identifier des génotypes présentant des caractères agronomiques d'intérêt. Dans ce contexte plusieurs questions se posent :

- comment mettre en évidence l'existence d'un contrôle épigénétique lors d'un phénomène biologique ?
- comment établir un lien entre la méthylation de l'ADN et différents phénotypes, ou différents caractères agronomiques ?
- comment identifier les épiallèles associés ?
- comment valider ces épiallèles comme biomarqueurs d'un phénotype ou d'un caractère agronomique ?



**Publication n°1: Gentil, M.-V., and Maury, S. (2007)** Characterization of epigenetic biomarkers using new molecular approaches (chapter 16). In **Genomics-Assisted Crop Improvement: Genomics Approaches and Platforms**. Varshney, Rajeev ; Tuberosa, Roberto (Eds.) Springer, *Vol 1* pp351-370. (Pas de facteur d'impact mais un article évalué par un comité de lecture).

6.

## CHAPTER 16

# CHARACTERIZATION OF EPIGENETIC BIOMARKERS USING NEW MOLECULAR APPROACHES

MARIE-VÉRONIQUE GENTIL AND STÉPHANE MAURY\*

*Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES EA 1207, rue de Chartres.  
BP 6759. Faculté des sciences, Université d'Orléans. 45067 Orléans Cedex 2, France*

**Abstract:** Plants exhibit a polymorphism of DNA methylation status in their genomes in relation to various breeding traits and phenotypes. Evidence for relationships between DNA methylation and given phenotypes can be shown through the variations of phenotypes after treatments that alter DNA methylation percentages or through the variations of methylation percentages in different phenotypes. The corresponding “epialleles” are potential biomarkers for plant breeding selection. The target genes of these epigenetic modifications could be identified with a genome scanning approach using methyl-sensitive enzymes or methyl-binding affinity columns. Correlations between DNA methylation polymorphism and phenotypes could be tested using various methods such as bisulfite sequencing, physiological and genetic analyses. Identification of methylation biomarkers by these new molecular approaches have been successfully applied to human cancer detection and should be now envisaged for plant breeding selection.

**Keywords:** Bisulfite sequencing; DNA methylation; Epiallele; Plant breeding; Restriction Landmark Genome Scanning

### 1. INTRODUCTION: THE FUNDAMENTAL ROLE OF EPIGENETIC EVENTS IN PLANT DEVELOPMENT

Contrary to animals, plants are static organisms and consequently exhibit high developmental plasticity in response to environmental variations. Plasticity is a term used to describe the ability of organisms to change form or shape and growth in response to environmental changes (Pigliucci, 2001). Variations of phenotypes without modifications of DNA sequences correspond to epigenetic

---

\*Corresponding Author: stephane.maury@univ-orleans.fr

phenomena. Epigenetic defines all mitotically and meiotically heritable changes in gene expression that are not coded in the DNA sequence itself (Holliday, 1990). In plants, epigenetic phenomena controlled many biological processes such as development, morphogenesis, genomic imprinting, somaclonal variations, heterosis, transgene silencing and stress responses. Epigenetic regulation is mediated by DNA methylation and histones modifications that regulate chromatin condensation and consequently gene expression.

In plants, addition of a methyl group from S-adenosyl-L-methionine to cytosine residues occurs at CpG or CpNpG sequences (where N could be any nucleotide). This reaction is catalysed by DNA methyltransferases. *Arabidopsis* MET1 (homologue of the DNA methyltransferase 1 in mammals) and plant-specific chromomethylases are responsible for the methylation of hemi-methylated sites during DNA replication and are referred to maintenance methylation (Finnegan and Kovac, 2000). Maintenance of CpG methylation and CpNpG are respectively catalyzed by MET1 and chromomethylases. The domain rearranged methyltransferase family (similar to the mammalian DNA methyltransferase 3 family) is involved in the methylation of unmethylated DNA, a process called *de novo* methylation (Cao et al., 2000; Tariq and Paszkowski, 2004). In plants, the demethylation of cytosine residues seems to occur both through the action of a DNA glycosylase and through cell division without maintenance methylation (Choi et al., 2002).

Another mechanism controlling gene expression is the covalent modifications of histones. Thus, free N-terminal tails of histones protrude from the octameric protein's core and are subjected to various posttranslational modifications, including acetylation, phosphorylation, methylation, ribosylation and ubiquitinylation (Meyer, 2001; Loidl, 2004). All these modifications constitute the "histone code" that presents more combinatorial possibilities in plants than in animals. DNA methylation and histone methylation on lysine 9 of histone H3 (H3-K9) are generally associated to the condensed chromatin status that prevents the binding of transcription factors and induces transcriptional gene silencing. On the contrary, histone acetylation, phosphorylation and methylation on lysine 4 of histone H3 (H3-K4) are present in the decondensed chromatin status that allows gene transcription (Meyer, 2001) (Figure 1).

Polymorphism in DNA methylation status leads to differences in genes expression and confers phenotypic effects (Ronemus et al., 1996; Kakutani et al., 1999). For instance, *SUPERMAN* gene plays a role in floral morphology in *Arabidopsis*. *SUPERMAN* gene presents several *clark kent* alleles which correspond to different phenotypes. However, if all these alleles exhibit the same DNA sequence they differ in their methylation status and correspond to epiallele (Kalisz and Purugganan, 2004). The polymorphism associated to these epialleles constitutes biomarkers for various applications. Indeed, a biomarker is a substance or a process that is indicative of a phenotype or a biological event (Laird, 2003). For example, in human cancers, epialleles are used as biomarkers for early detection or characterization of cancer types. In plants, epigenetic inheritance is a source of polymorphism that could be exploited for selection and plant breeding (Tsafaris et al., 2005). Nevertheless, only

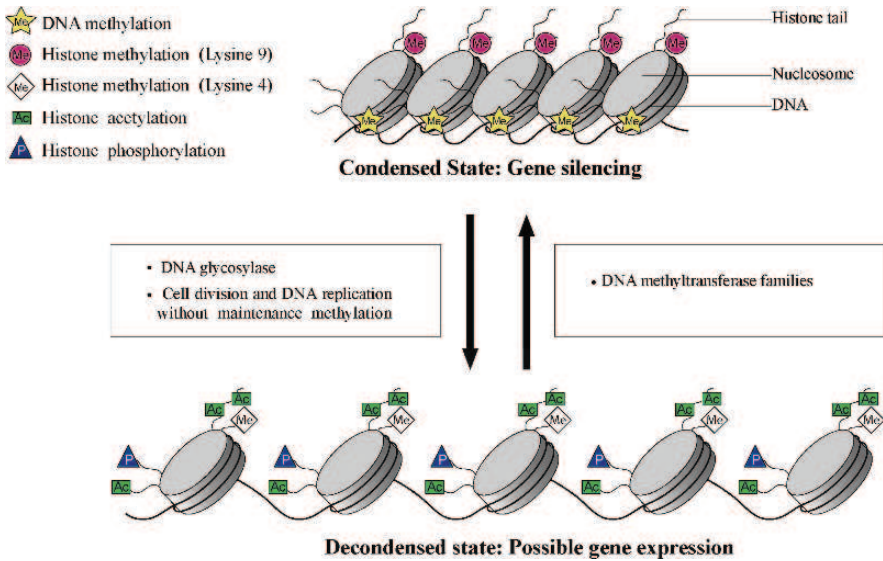


Figure 1. Model for the regulation of chromatin structure in plants. Only the processes controlling DNA methylation status are indicated (see plate 12)

few data are available concerning epialleles in plants (Finnegan, 2001). Indeed, current methods of molecular biology such as DNA sequencing do not distinct methylation status. In this chapter, we present new molecular approaches to establish relationships between phenotype or breeding trait and DNA methylation status. The discovery of methylation biomarkers or epialleles by scanning approaches is also presented. Finally, the validation of methylation biomarkers for a given phenotype or breeding trait by an original gene candidate approach will be discussed.

## 2. DNA METHYLATION AND PLANT BREEDING: EVIDENCE FOR AN EPIGENETIC REGULATION

In order to establish relationships between a breeding trait or a phenotype and DNA methylation polymorphism, two strategies have been used (Table I). Firstly, the modification of genomic DNA methylation levels by physical, chemical treatments or genetic manipulations and the analysis of the consequences on the phenotypes. Secondly, the determination of the global genomic DNA methylation percentage in distinct phenotypes.

### 2.1. Modification of Genomic DNA Methylation Levels

#### 2.1.1. DNA hypo- or hyper-methylation treatments

DNA hypomethylation is obtained using analogues of cytosine such as 5-azacytidine, 5-azacytosine or 5-azadeoxycytosine (Causevic et al., 2005). Nitrogen on the position 5 in the pyrimidine ring forbidden the methylation of these

Table I. A synopsis of the study of methylation biomarkers

Steps	Strategies	Methods
1. Evidence for an epigenetic regulation by DNA methylation	– Modification of DNA methylation levels	– <b>DNA hypo- or hyper-methylating treatments</b> (Causevic et al., 2005) – <b>Genetic transformation</b> (Vongs et al., 1993; Ronemus et al., 1996; Finnegan et al., 1996)
	– Determination of the global DNA methylation levels	– <b>Chromatographic analysis: HPLC or HPCE</b> (Fraga et al., 2000; Causevic et al., 2005; Johnston et al., 2005)
2. Scanning approach for the discovery of methylation biomarkers	– Screening for genomic sequences with distinct DNA methylation status	– <b>Methylation-sensitive enzymes: RLGS, SPM or MSAP, tiling microarrays</b> (Xiong et al., 1999; Costello et al., 2002; Shiraishi et al., 2004a; Lippman et al., 2005; Martienssen et al., 2005; Causevic et al., 2006; Takamiya et al., 2006) – <b>Affinity chromatography:</b> MBD or 5mC (Cross, 2002; Shiraishi et al., 2004b; Salzberg et al., 2004)
	– Cloning of the sequences	– <b>Adapters ligation and PCR amplification</b> (Causevic et al., 2006) – <b>Biotinylated linkers and PCR amplification</b> (Takamiya et al., 2006) – <b>Promoter library and PCR amplification</b> (Yu et al., 2004)
3. Gene candidate (GC) approach for the validation of methylation biomarkers	– Choosing the GC(s)	– <b>Physiological studies</b> (Causevic et al., 2006) – <b>Scanning approach</b> (Causevic et al., 2006)
	– Determination of the methylation status for GC(s)	– <b>Methylation-sensitive enzymes:</b> Southern blotting (Moore, 2001; Causevic et al., 2006) – <b>Bisulfite-PCR: COBRA, MS-PCR...</b> cloning and sequencing or direct pyrosequencing. (Herman et al., 1996; Xiong and Laird, 1997; Shiraishi et al., 2002; Laird, 2003; Dupont et al., 2004; Causevic et al., 2006; Ogino et al., 2006)

- Validation of the methylation biomarkers (should be define in each case)
  - **Physiological analyses** of GC(s) expression at mRNA (northern blotting, microarrays, qRT-PCR) or protein (activity, western blotting, 2D electrophoresis-mass spectrometry) levels
  - **Genetic transformation** (mutagenesis, sense or antisense transgene, RNAi, homologous recombination) and functional complementation
  - **Analysis of the epigenetic inheritance:** estimate the extent to which methylation status of the markers are linked to the phenotypic variation among individuals within a selection population
- 

molecules. The incorporation of these analogues in DNA during cell replication induces a progressive DNA hypomethylation status in the daughter cells. Treatments with cold temperatures were also shown to induce DNA hypomethylation (Finnegan et al., 1998). DNA hypermethylation is achieved using hydroxyurea which inhibits ribonuclease and replication. Modifications of the methyl donor (S-adenosyl-L-methionine) contents also lead to efficient variations of global DNA methylation.

A recent report has evaluated the potential of all these treatments to modify DNA methylation level in one plant system. Thus, eight distinct treatments such as three analogues of cytosine, cold treatment, ethionine, diaminobutanone, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and hydroxyurea have induced DNA hypo- or hyper-methylation on three sugarbeet cell lines displaying distinct morphogenetic status (Causevic et al., 2005). In this collection of treated lines with  $\pm 10\%$  methylcytosine percentages, variations of morphogenetic status were observed: loss of organogenic potential and dedifferentiation. Altogether, these results give evidence for a relationship between DNA methylation levels and morphogenesis status in sugarbeet cell lines. Such relationship has also been reported in many other plant systems (Burn et al., 1993; Lambé et al., 1997; Kaeppler et al., 2000).

### 2.1.2. Genetic transformation

The analysis of mutants and transgenic plants has allowed establishment of correlations between DNA methylation levels and plant development. In antisense DNA methyltransferase 1 lines, a progressive loss of genomic DNA methylation from generation to generation induces deleterious phenotypes, such as reduction in fertility and altered apical dominance (Finnegan et al., 1996). In *ddm* (decrease in

DNA methylation) *Arabidopsis* mutant encoding a chromatin remodelling protein, many morphological abnormalities were reported (Vongs et al., 1993). All these data demonstrate the importance of DNA methylation control for plant development.

## 2.2. Determination of Global DNA Methylation Levels

Two techniques have been improved these last years to determine the global DNA methylation levels after genomic DNA hydrolysis: High-performance liquid chromatography (HPLC) and High-performance capillary electrophoresis (HPCE). They allow the quantification of methylcytosine and the calculation of a percentage of DNA methylation in the genome.

HPLC is considered as the most reliable and sensitive technique to determine DNA methylation. DNA is digested by enzymatic, thermic or acid treatments. Nucleotides, nucleosides or bases are then separated in by HPLC (Figure 2A). Quantification is achieved by using UV detection (Causevic et al., 2005; Johnston et al., 2005) or laser induced fluorescence system (Wirtz et al., 2005), where lower sample amounts are required for analysis. Nucleoside analysis is recommended because nucleotides and bases are more polar and consequently more difficult to separate by HPLC. Identification of cytosine (C) and methylcytosine (mC) is assessed by co-migration with commercial standards under the same HPLC conditions. The methylcytosine percentages are calculated using the following formula:  $\%mC = (mC/(C+mC)) \times 100$  (Figure 2B). HPLC analyses have been used to characterize DNA methylation levels in many phenotypes (Causevic et al., 2005; Johnston et al., 2005).

HPCE using a sodium dodecyl sulfate micelle system allows separation of bases from acid hydrolyzed genomic DNA (Fraga et al., 2000). This method gives a faster and a better separation than HPLC for the quantification of cytosine and methylcytosine in genomic DNA of plants.

Overall, HPLC and HPCE allow rapid, accurate and readily automatable quantitative results by measuring overall methylcytosine contents from appropriately hydrolyzed DNA samples. However, they require relatively large amounts of genomic DNA, limiting the applicability of the methods. Furthermore, they could only provide information on methylation levels of genome and gene-specific information would be masked.

Several other methods have also been described such as liquid chromatography-mass spectrometry separation, anti-methylcytosine immunological techniques and bisulfite conversion. Nevertheless, their use was restricted to punctual applications (Laird, 2003).

## 2.3. Perspectives: Research of Epigenetic Biomarkers for Plant Breeding

In plants, epigenetic mechanisms control gene expression during various biological processes and can be transmitted over many generations. Polymorphism of the

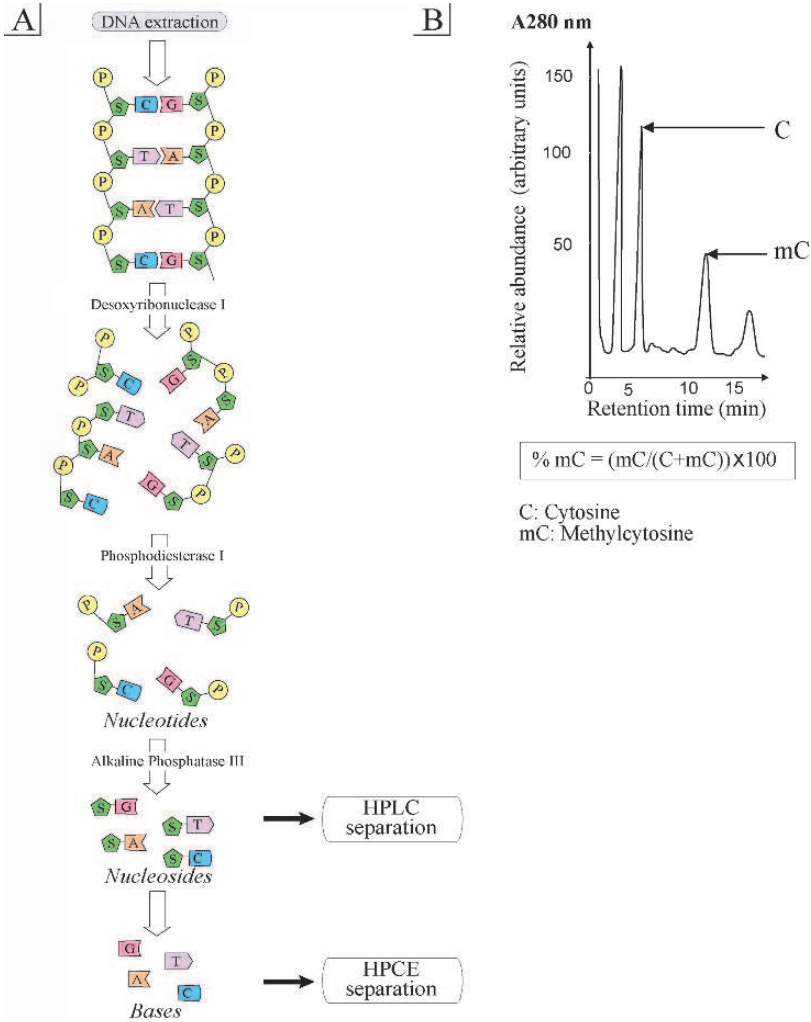


Figure 2. Determination of global genomic DNA methylation levels: A, Enzymatic DNA hydrolysis. B, HPLC chromatogram for the determination of methylcytosine percentage. P: Phosphate group. S: Sugar. A, T, C and G: Bases (see plate 13)

epialleles could be used to distinguish individuals or genotypes within population. Detection of global methylation levels allows calculation of methylcytosine percentages that could be correlated to the variations of a quantitative trait. Nevertheless, this result gives no indication on the target genes of the DNA polymorphism. The research of methylation biomarkers and their validation for various applications is well developed in the field of human cancer and could now be envisaged for plant breeding.



### 3. THE GENOME SCANNING APPROACH FOR DISCOVERY OF METHYLATION BIOMARKERS

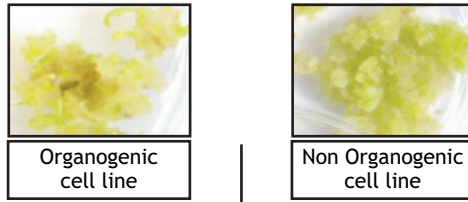
#### 3.1. Scanning Approach

DNA methylation biomarkers will be of great interest for plant breeding. How to identify these modifications among millions of CpG dinucleotides and tens of thousands of gene-associated CpG islands? that are 500-base-pair windows with a G:C content of at least 55% and an observed over expected CpG frequency of at least 0.65 (Laird, 2003).

The objective of this part is to present an approach allowing the discovery of methylation biomarkers in plants. Therefore, the methodology must scan the CpG islands within the genome in order to select loci with distinct methylation profile between two or more biological plant samples. Several techniques have been developed on animal systems and only few of them have actually been applied on plant systems (Costello et al., 2002; Frühwald and Plass, 2002; Mills and Ramsahoye, 2002; Shiraishi et al., 2002; Laird, 2003; Shiraishi et al., 2004b). This part presents a subset of these techniques with potential applications for the research of plant breeding markers (Table I). Among them, the Restriction Landmark Genome Scanning (RLGS) method has retained specific attention. Thus, RLGS method provides a quantitative epigenetic assessment of several gene-associated CpG islands in a single gel without prior knowledge of gene sequence and has been successively applied on animal and plant systems (Hatada et al., 1991; Matsuyama et al., 2000; Costello et al. 2002; Rush and Plass, 2002; Matsuyama et al. 2003; Causevic et al., 2006; Takamiya et al., 2006).

#### 3.2. Identification of Methylation Biomarkers by Restriction Landmark Genome Scanning (RLGS)

After isolation of concentrated solution of pure genomic DNA without mechanical breakings, an enzymatic processing is performed with an infrequently cutting restriction enzyme that can not cleave methylated CpG sites (Figure 3). *Not* I was selected as the landmark enzyme since most of its sites (GCGGCCGC) is within CpG islands (Costello et al., 2002). Recently, an alternative approach was published using two isoschizomers *Hpa* II and *Msp* I that recognize the same sequence (CCGG), but have different methylation sensitivity. *Msp* I cleaves this site if the second C of CCGG is methylated or not. *Hpa* II could only cut if the site is not methylated. This method directly discriminates methylation polymorphism from sequences (Takamiya et al., 2006). Cohesive extremities of these restriction fragments are filled with radionucleotides. A second restriction enzyme can be used as *EcoRV* (blunt end) to increase the number of fragments before the first electrophoretic separation on 30 cm thin 2 mm diameter agarose gel tube. Then, DNA is *in gel* digested by *Hinf* I, a more frequently cutting enzyme, and electrophoresed in a second perpendicular direction



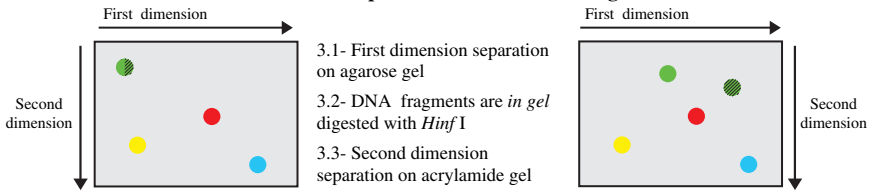
**1- Extraction of genomic DNA**

**2- Preparation of restriction fragments:**

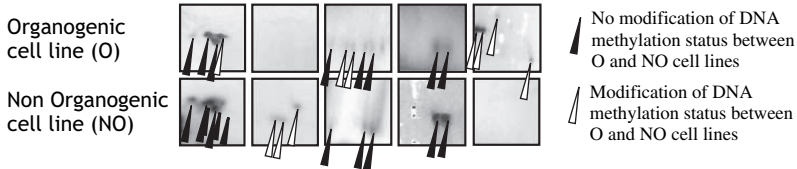
- 2.1- Landmark enzyme *Not* I cleaves only if first cytosine in rich palindrome site GCGGCCGC is not methylated
- 2.2- Radioactive labeling of restriction fragments with dCTP and dGTP with <sup>32</sup>P (☼)
- 2.3- Fragments are cutted with *Eco* RV



**3- Bidimensional separation of restriction fragments:**



**4- Autoradiographic film analysis:**



**5- Elution of DNA fragments from spots for cloning**

Figure 3. Principle of Restriction Landmark Genome Scanning (RLGS) method for the discovery of methylation biomarkers. RLGS sections were obtained with DNA extracted from organogenic or non-organogenic sugarbeet lines. Spots indicated by arrows correspond to fragments that can be superposed (black) or not (white) on the RLGS sections obtained with both lines. (Adapted from Causevic et al., 2006) (see plate 14)

on  $30 \times 40$  cm non denaturing polyacrylamide gel. Finally, the gel is autoradiographed (Figure 3). The profiles are highly reproducible and display both the copy number and methylation status of the sequences. The comparison of autoradiogrammes of distinct phenotypes allows the identification of two groups of spots: (1) spots that are unique in one of the two RLGS profiles, suggesting remodelling of the methylation status of some CpG rich loci and (2) spots that can be superposed in both RLGS profiles and that present no polymorphism of DNA methylation on *Not* I sites. In this last case, the intensity of the spots reflects the copy numbers that can differ between the biological samples.

### 3.3. Cloning and Sequencing of the Methylation Biomarkers

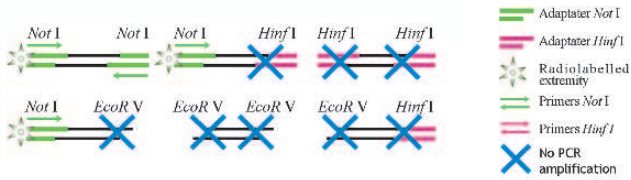
The DNA fragments screened by RLGS have a high probability of containing a gene and are of ideal length for cloning and sequencing (Costello et al, 2002). Three restriction enzymes have successively cut genomic DNA and the labelling was performed on *Not* I extremities. Therefore, the cloning strategy of these fragments, that are present in the gel in low amount, should specifically amplify *Not* I/*Not* I and *Not* I/*Hinf* I fragments among all the generated fragments (*EcoRV/EcoRV*; *EcoRV/Hinf* I; *EcoRV/Not* I; *Hinf* I/*Hinf* I) (Figure 4) (Causevic et al., 2006). The first step consists to the ligation of *Not* I and *Hinf* I adaptaters at the extremities of the restriction fragments (Table I). Then, specific primers designated on the *Not* I adaptaters are used to enrich by PCR the *Not* I/*Not* I fragments at the expense of the others. A second PCR with specific primers designated on the *Not* I and *Hinf* I adaptaters is then performed. These PCR products are cloned in an adapted vector using available kits. Alternative cloning strategies using biotinylated linkers or promoter library have also been reported for the cloning of RLGS fragments obtained from tumorous cells (Yu et al., 2004; Takamiya et al., 2006).

The results of homology studies by comparison with Databanks allow annotation for these sequences. RLGS exhibits several advantages compared to PCR-based method (Costello et al., 2002; Rush and Plass, 2002; Laird, 2003): (1) high probability of CpG islands sequences containing gene, (2) large number of sequence could be analyzed simultaneously, (3) quantitative and qualitative high reproducible information, (4) no biased or difficulty of PCR amplification. Nevertheless, this technique that depends on methyl-sensitive restriction enzyme is poorly suited for routine analysis and is more designated for methylation biomarkers discovery.

### 3.4. Applications and Perspectives of Methylation Biomarkers Isolated by RLGS

Several publications demonstrate the successful use of RLGS to identify modifications of DNA methylation, particularly in tumorous cells (for a review see

1- Ligation with *Not* I and *Hinf* I adaptaters. First PCR using primers designed on *Not* I adaptaters allow amplification *Not* I / *Not* I fragments.



2- Second PCR using primers designed on *Not* I and *Hinf* I adaptaters allow amplification of *Not* I / *Not* I and *Not* I / *Hinf* I fragments.



3- Amplified fragments are subcloned in adapted vector.

4- Sequencing and analysis.

Figure 4. Cloning strategy for epigenetic biomarkers screened by RLGS using adaptaters and PCR amplifications (see plate 15)

Rush and Plass 2002). Thus, DNA methylation changes occurred in carcinogenesis and are potentially good early indicators of disease, especially those where symptoms appeared lately as ovarian, pancreatic and lung cancer (Laird, 2003). In plants, RLGS has already been used to screen the global methylation status in the *Arabidopsis* genome (Matsuyama et al., 2003), to analyze DNA deletions in an albino mutant genome (Abe et al., 2002), to discriminate for methylation polymorphism in the *Arabidopsis* genome (Takamiya et al., 2006) and to screen for methylation biomarkers of *in vitro* morphogenesis in sugarbeet cell lines (Causevic et al., 2006). In this last situation, an experimental system composed of two *in vitro* sugarbeet callus lines originating from the same mother plant and exhibiting different status of differentiation was used. One line is organogenic (O) with continuous production of leafy shoot and active photosynthesis. Another line is non-organogenic (NO) and photosynthetically active (Hagège et al., 1991; Causevic et al., 2005; Causevic et al., 2006). A relationship between the differentiation status of these lines and their genomic DNA methylation levels was first demonstrated (Causevic et al., 2005). These cell lines represent an interesting model for the research of methylation biomarkers of plant *in vitro* morphogenesis. Among potential sugarbeet morphogenesis DNA markers that were cloned and sequenced, five are homologous to genes involved in cell cycle and embryogenesis and two in metabolic functions. These results are in good agreement with the potential of these sequences as biomarkers of morphogenesis in sugarbeet cell lines. The two last biomarkers presents homologies with protein of unknown function and display a great interest since it is the first report of a functional annotation for these sequences.

### 3.5. Other Techniques for the Discovery of Methylation Biomarkers

Several methods have been developed to screen the genome for modifications of CpG islands methylation (Table I; Frühwald and Plass, 2002; Shiraishi et al., 2002; Laird, 2003). Some of them used also methyl-sensitive enzymes as Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP) (Xiong et al., 1999) and Segregation of Partly Melted molecules (SPM) (Shiraishi et al., 2004a). This last one is a convenient and efficient method to isolate CpG islands methylated sequences on denaturing gradient gel electrophoresis. Recently, an epigenomic mapping including a DNA methylation profiling in the *Arabidopsis* genome was performed using tiling microarrays (Lippman et al., 2005; Martienssen et al., 2005). This powerful tool is composed of genomic tiling microarrays which represent contiguous stretches of chromosomes without bias toward coding sequencing. After shearing of genomic DNA by nebulization, DNA is digested with McrBC that allows DNA to be depleted of methylated sequences. The digested DNA and an untreated sample are size-fractionated, differentially labelled and hybridized to genomic tiling microarrays. This method allows DNA methylation pattern of all sequence types to be assayed simultaneously at high resolution. Methods have also been developed to map epigenetic quantitative trait loci (QTL) defines as QTL activated by an epigenetic event and that exhibit the potential to alter the developmental trajectory of a growth trait (Pigliucci, 1998; Wu et al., 2002).

Another group of methods using methyl binding affinity chromatography has recently retained specific attention. These methods are insensitive to the methylation status of specific internal recognition sites and provide useful information on CpG islands methylation (Shiraishi et al., 2004b). Methyl-CpG Binding Domain (MBD) column consists of an affinity matrix containing a polypeptide derived from the methyl-CpG binding domain of MeCP2 protein. MBD synthesized *in vitro* contains an additional six consecutive histidine residues attached to the amino terminus bound to nitrilotriacetic acid-agarose by chelation with nickel ion (Cross et al., 1994; John and Cross, 1997; Cross, 2002; Shiraishi et al., 2004b). DNA fragments are loaded onto this affinity column and are eluted by a linear or stepwise gradient of sodium chloride. The eluted DNA fragments are subjected to PCR amplification or Southern experiments allowing the identification of methyl-CpG sequences in a given genome providing interesting information on the functional organization of genomes. As one MBD protein will bind to a single CpG sequence, number and density of methylated CpG sites determine the separation. The sequence preference of MBD column is not clear since contradictory results have been reported *in vitro* and *in vivo* (Shiraishi et al., 2004b). Furthermore, hemimethylated or methylated CpNpG sequences in plants could not bind to such column. Therefore, another methyl binding affinity column was developed: an anti-5-methylcytosine affinity column. This system that binds all methylated sequences (hemimethylated or not, CpG and CpNpG) has been successfully applied on several systems (Salzberg et al., 2004). Application of this method on plants for crop improvement and comparison to the other scanning methods should be performed (Salzberg et al., 2004; Shiraishi et al., 2004b).

## 4. THE GENE CANDIDATE APPROACH FOR VALIDATION OF EPIGENETIC BIOMARKERS

### 4.1. Gene Candidate Approach

Many agronomic traits, resulting from the interactions of multiple genes under environmental influence, show quantitative inheritance. Nevertheless, the partial effect of each gene on the phenotypic variation and their imprecise localization on genomic maps lead researchers to use a gene candidate approach to characterize QTL instead of positional cloning or insertional mutagenesis (Pfieglar et al., 2001). The gene candidate approach corresponds to the use of sequenced genes of known function (structural genes or regulatory genes) that could correspond to major loci. The working hypothesis is that a molecular polymorphism within the candidate genes (CGs) is linked to the major loci or QTLs, or is statistically associated with the variations of the trait. The gene candidate approach is composed of three steps: (1) choosing the CG(s) using physiological or linkage data, (2) screening the CG(s) by revealing a polymorphism and (3) validating the CG(s) using various physiological or genetic analyses.

In the context of the study of epigenetic biomarkers, the working hypothesis of the CG approach becomes the research of a polymorphism of methylation status within the CG(s) that is linked to the major loci or QTLs, or that is statistically associated with the phenotypic variations. The three classical steps are adapted as follow (Table I): (1) choosing the CG(s) according to physiological data or genomic screening of sequences done by scanning approach, (2) Determining of polymorphism that corresponds to variation of the status of methylation within CG(s) performed by Southern blot or bisulfite-PCR, (3) validating of the CG using physiological, genetic and inheritance analyses in a selection population.

### 4.2. Analysis of Methylation Status

#### 4.2.1. Southern blot

This technique is still widely used due to its robustness, reproducibility and relative simplicity (Moore, 2001). Genomic DNA samples digested with methylation-sensitive enzymes (that do not cut if their recognition sequence is methylated) such as *Pvu* II, *Taq* I, *Not* I and *Hpa* II are electrophoretically separated, blotted on membrane and hybridized with probes corresponding to a part of the CG sequences. If distinct patterns of bands are observed between samples, it reveals a methylation polymorphism and suggests an epigenetic control of the expression of this CG. This basic method has been used, for example, to show that several CGs related to cell wall differentiation or cell redox status have distinct methylation status depending on the morphogenetic status of sugarbeet cell lines (Causevic et al., 2005; Causevic et al., 2006). Nevertheless, the weak number of methylation-sensitive restriction sites in CGs, the variable efficiency of the cutting, the availability of specific probes in many crop plants, the high amounts of DNA needed, the sensitivity and scalability of this method are clear limitations.

#### 4.2.2. Bisulfite sequencing

A revolutionary method employing bisulfite treatment of genomic DNA and subsequent PCR amplification has been introduced in the nineties (Frommer et al., 1992; Clark et al., 1994). This method, contrary to Southern blot, is insensitive to the methylation status of specific internal recognition sites and as a consequence provides a robust qualitative and quantitative method for detailed methylation profiling (Hajkova et al., 2002; Shiraishi et al., 2002; Laird, 2003; Shiraishi et al., 2004b; Causevic et al., 2005). The bisulfite reaction leads to the conversion of cytosines into uracil residues after hydrolytic deamination (Figure 5). However, methylated cytosine remains largely intact. Subsequent PCR amplification, cloning and sequencing convert nonmethylated cytosine to thymine, while methylated cytosine are detected as cytosine. This enables to determine the methylation status at any CpG or CpNpG sites on both DNA strands in a CG. Quantitative information could be obtained by sequencing several individual clones of bisulfite-PCR products or by using the pyrosequencing technology (Dupont et al., 2004; Causevic et al., 2006). An example is shown in Figure 5, where a specific primer from the 5' region of one CG for the *in vitro* morphogenesis, catalase sequence, was designed. This figure shows distinct patterns of methylation in the three sugarbeet cell lines at distinct morphogenetic status (Causevic et al., 2006). Furthermore, the frequencies of methylated CpG dinucleotides were variable between cell lines. Thus, the proportion of methylated CpG sites scaled negatively with the levels catalase activities measured in the three sugarbeet cell lines (Figure 5; Causevic et al., 2006). Bisulfite sequencing confirmed the distinct methylation profiles of catalase, which was previously proposed by Southern blot analysis. Altogether, these results demonstrated a direct connection between epigenetic regulation and the expression of these biomarkers during morphogenesis.

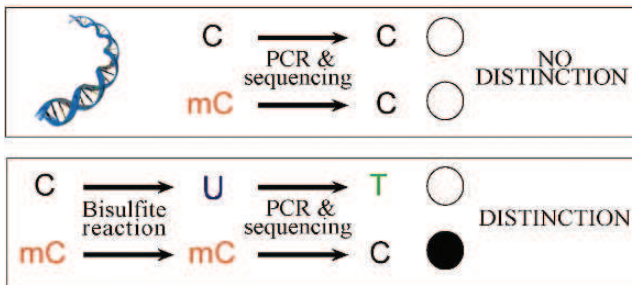
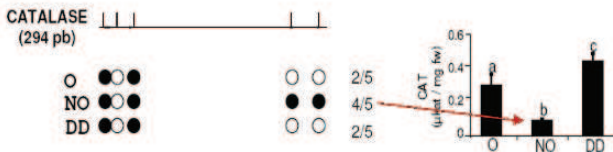
In spite of richness of informations obtained from bisulfite-mediated sequencing, the method is relatively expensive, time-consuming and difficult to apply to a several-kb chromosomal region. In that sense, several modifications of the original protocol improving the sensitivity and quality of the results have been published (Mills and Ramsahoye, 2002; Shiraishi et al., 2002; Laird, 2003). Several alternative methods, based on bisulfite treatment and subsequent PCR amplification, have been developed to overcome sequencing high cost. Combined bisulfite restriction analysis (COBRA; Xiong and Laird, 1997) and methylation-specific PCR (MS-PCR; Herman et al., 1996) methods are fast and cost-effective, which would be suitable for screening or discrimination of a large set of samples (Mills and Ramsahoye, 2002). Employment of real-time PCR improves also quantitateness of these bisulfite based methods (Eads et al., 2000; Ogino et al., 2006).

### 4.3. Validation of Epigenetic Biomarkers

Few reports are now available to compare the results between scanning and/or candidate approaches (Shiraishi et al., 2002; Salzberg et al., 2004; Yu et al., 2004; Mils and Ramsahoye, 2002; Laird, 2003; Causevic et al., 2006). Nevertheless,

**A****Bisulfite sequencing**

- Extraction of genomic DNA.
- Treatment by hydroxyquinone/bisulfite in order to deaminate unmethylated cytosine into uracile.
- PCR amplification with specific primers on genomic DNA treated or not.
- Subcloning of PCR products in a vector.
- Sequencing of about 10 clones by sequence.

**B**

*Figure 5. A, Principle of bisulfite-PCR sequencing method for the determination of the methylation status of gene candidates. B, Results of the methylation analysis of 5' regions of sugarbeet catalase gene by bisulfite sequencing. The potential methylated CpG sites in the sequence are indicated by perpendicular lines. For the three cell lines organogenic (O), non organogenic (NO) and dedifferentiated (DD), 6 to 10 PCR products were subcloned and sequenced. Five CpG sites were considered to be methylated when more than half the clones retained an unmodified cytosine at that position. Methylated CpG sites (Filled circles) and unmethylated CpG sites (open circles) are shown. The proportions of methylated CpG sites are indicated on the right for catalase activity was measured in the O, NO and DD sugarbeet cell lines. Data are means  $\pm$  SE from three independent replicates. Values marked with different letters are significantly different between cell lines ( $P \leq 0.05$ ) as determined by oneway ANOVA. *fw* fresh weight. (Adapted from Causevic et al., 2006)*

it should be mentioned that in many cases, methylation status varies depending on target sequences and the approach used. All the authors usually agree that combination of methods compensates for the deficiencies associated with each



method and enables a more accurate characterization of the methylation status of CpG islands.

Validation is more or less complex according to the nature of the breeding trait. Physiological studies will determine the expression of the epigenetic markers at the mRNA level (quantitative RT-PCR, northern blotting or microarray analyses) and/or protein level (enzymatic activity, western blotting or two-dimensional electrophoresis coupled to mass spectrometry) in various genotypes, in individuals within a selection population or under various environmental conditions. Genetic transformation (sense or antisense strategies, RNAi or homologous recombination) is the ultimate way to validate these markers. All these analyses display limitations and will only provide arguments but not undisputed evidence for or against the role of the epigenetic markers (Pfieglar et al., 2001). Finally, the analysis of the inheritance of epigenetic polymorphism and its statistical relationship with variations of the breeding traits in individuals of a selected population should be done.

## **5. CONCLUSION: THE POWER AND PROMISE OF DNA METHYLATION BIOMARKERS FOR PLANT BREEDING**

DNA methylation is a key event for the regulation of gene expression. Quantitative differences in gene expression control different physiological processes and consequently phenotypic diversity (Tsaftaris et al., 2005). Heritable phenotypic variation in a population is the basis for selection and breeding. DNA methylation is affected by the developmental stage, growth conditions and genotype, and consequently is a major source of variation for selection. DNA methylation biomarkers (epialleles) reflect genetic variation and environmental effects but also contribute actively to the phenotype.

Three successive complementary approaches should be followed to characterize methylation biomarkers (Table I). (1) A relationship must be established between the variations of a breeding trait and the global level of DNA methylation and/or the status of methylation of some genes, (2) few genes must be selected (CG approach or discovery approach by genome scanning), (3) the methylation status of these genes and / or their expression profile must be followed in many genotypes under specific experimental conditions in order to validate these biomarkers.

As opposed to plants, in mammals most of the epigenetic alterations are associated to disease and are rarely inherited (Jones and Baylin, 2002; Chong and Whitelaw, 2004; Robertson, 2005; Zilberman and Henikoff, 2005). Thus, many methods for the discovery and validation of methylation biomarkers were developed on tumorous cells allowing sensitive detection of disease or markers associated with disease progression (Laird, 2003). All these methods display specific advantages and limitations. Therefore, a combination of methods should be used and few additional reports are also needed to compare methods among them (Frühwald and Plass, 2002; Shiraishi et al., 2002; Laird, 2003).

Many efforts have already been made to use methylation biomarkers in human cancer diagnostic. However, only a small amount of preliminary data is actually

available regarding plants, for identification and varieties or hybrids creation and marker-assisted selection. Furthermore, the identification of epigenetic markers may lead to the cloning of new genes of agronomic importance and will allow a better understanding of the biological mechanisms controlling the development and the growth of plants of economic interest. Moreover, analysis will help to elucidate mechanisms controlled by epigenetic phenomena such as somaclonal variation, heterosis, parental imprinting, transgene silencing and environmental responses that constitute tremendous commercial interest for breeders and industrialists (Tsaftaris et al., 2005; Varshney et al., 2005; Grant-Downton and Dickinson, 2006). The constant increase of interest for epigenetic phenomena in plants and the application of analytical methods on plant systems are very promising in the next year for a great development of such approach.

## ACKNOWLEDGEMENTS

A Ph.D. grant (M.-V. Gentil) was supported by the Conseil Régional de la Région Centre (France) and SES-Europe (Tienen, Belgium). The authors thank S. Barnes, F. Brignolas, A. Delaunay, F. Delmotte, D. Hagège, C. Joseph, M. Lefebvre and G. Moreau for their participation and continuous interest.

## REFERENCES

- Abe T, Matsuyama T, Sekido S, Yamaguchi I, Yoshida S, Kameya T (2002) Chlorophyll-deficient mutants of rice demonstrated the deletion of a DNA fragment by heavy-ion irradiation. *J Radiat Res* 43:157–161
- Burn JE, Bagnall DJ, Metzger JD, Dennis ES, Peacock WJ (1993) DNA methylation, vernalization and initiation of flowering. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:287–291
- Cao X, Springer NM, Muszynsky MG, Phillips RL, Kaeppler S, Jacobsen SE (2000) Conserved plant genes with similarity to mammalian de novo methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:4979–4984
- Causevic A, Delaunay A, Ounnar S, Righazza M, Delmotte F, Brignolas F, Hagège D, Maury S (2005) DNA methylating and demethylating treatments modify phenotype and cell wall differentiation status in Sugarbeet cell lines. *Plant Physiol Biochem* 43:681–691
- Causevic A, Gentil M-V, Delaunay A, El-Soud WA, Garcia Z, Pannetier C, Brignolas F, Hagège D, Maury S (2006) Relationship between DNA Methylation and histone acetylation levels, cell redox and cell differentiation status in Sugarbeet lines. *Planta* 224:812–827
- Choi Y, Gerhing M, Johnston L, Hannon M, Harada JJ, Goldberg RD, Jacobsen SE, Fischer RL (2002) DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in *Arabidopsis*. *Cell* 110:33–42
- Chong S, Whitelaw E (2004) Epigenetic germline inheritance. *Curr Opin Genet Dev* 14:692–696
- Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M (1994) High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucl Ac Res* 22:2990–2997
- Costello J, Smiraglia D, Plass C (2002) Restriction landmark genome scanning. *Methods* 27:144–149
- Cross SH (2002) Isolation of CpG islands using a methyl-CpG binding column. *Methods Mol Biol* 200:111–130
- Cross SH, Charlton JA, Nan X, Bird AP (1994) Purification of CpG islands using a methylated DNA binding column. *Nat Genet* 6:236–244
- Dupont J-M, Tost J, Jammes H, Glynné Gut I (2004) De novo quantitative bisulfite sequencing using the pyrosequencing technology. *Anal Biochem* 333:119–127

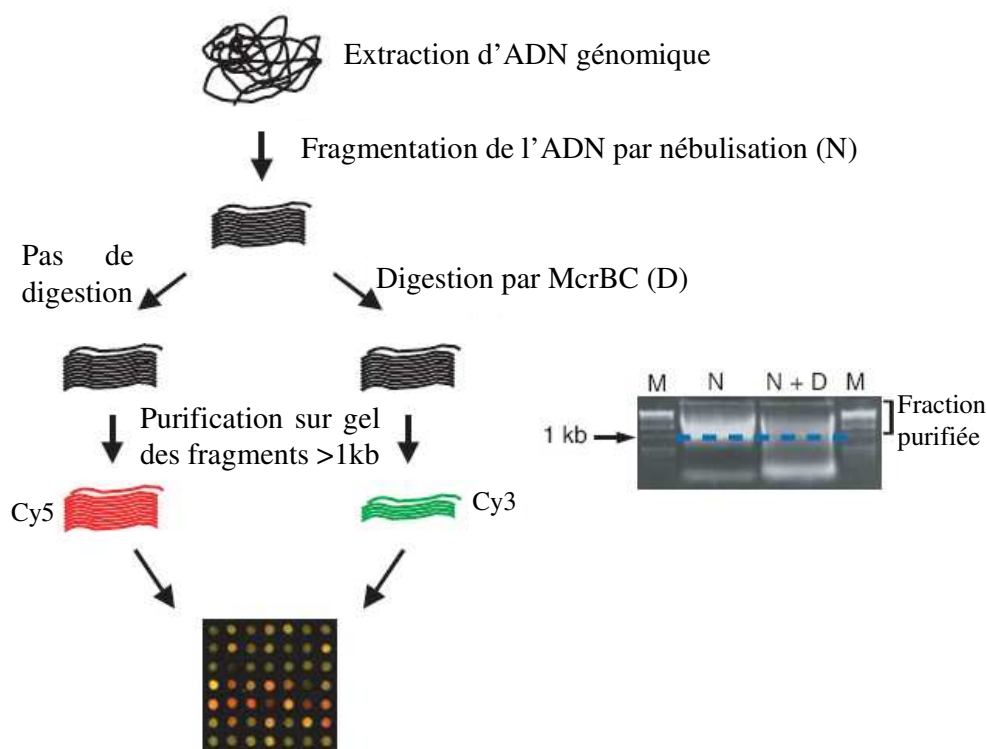
- Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, Danenberg PV, Laird PW, (2000) MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucl Ac Res* 28:E32
- Finnegan EJ (2001) Epialleles: a source of of random variation in time of stress. *Curr Opin Plant Biol* 5:1001–1106
- Finnegan EJ, Kovac KA (2000) Plant DNA methyltransferases. *Plant Mol Biol* 43:189–201
- Finnegan EJ, Peacock W, Dennis E, (1996), Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development, *Proc. Natl Acad Sci USA* 93:8449–8454
- Finnegan EJ, Genger R, Kovac K, Peacock W, Dennis E (1998) DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:5824–5829
- Fraga MF, Rodriguez R, Canal MJ (2000) Rapid quantification of DNA methylation by high performance capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 21:2990–2994
- Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul PL (1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1827–1831
- Frühwald MC, Plass C (2002) Global and gene-specific methylation patterns in cancer: aspects of tumor biology and clinical potential. *Mol Gen Met* 75:1–6
- Grant-Downton RT, Dickinson HG (2006) Epigenetics and its implications for plant biology 2. The “epigenetic epiphany”: epigenetics, evolution and beyond. *Ann Bot* 97:11–27
- Hagège D, Kevers C, Crevecoeur M, Tollier M, Monties B, Gaspar T (1991) Peroxidases, growth and differentiation of habituated sugarbeet cells. In: Lobarzewski HG. J, Penel C, Gaspar T (eds) *Biochemical molecular and physiological aspects of plant peroxidase*. University of Geneva, Geneva, Switzerland, pp 281–290
- Hajkova P, El-Maari O, Engemann S, Oswald J, Olek A, Walter J (2002) DNA-methylation analysis by the bisulfite-assisted genomic sequencing method. *Methods Mol Biol* 200:143–154
- Hatada I, Hayashizaki Y, Hirotsune S, Komatsubara H, Mukai T (1991) A genomic scanning method for higher organisms using restriction sites as landmark. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9523–9527
- Hermann JG, Graff JR, Myohanan S, Nelkin BD, Baylin SB (1996) Methylation specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9821–9826
- Holliday R (1990) DNA methylation and epigenetic inheritance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 326:329–338
- John RM, Cross SH (1997) Gene detection by the identification of CpG islands, in genome analysis: a laboratory manual. In: Birren B, Green ED, Klapholz S, Myers RM, Roskams J, (eds) *Detecting genes Vol. 2*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 217–285
- Johnston JW, Harding K, Bremner DH, Souch G, Green J, Lynch PT, Grout B, Benson EE (2005) HPLC analysis of plant DNA methylation: a study of critical methodological factors. *Plant Physiol Biochem* 43:844–853.
- Jones PA, Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Genetics* 3:415–428
- Kaeppler S, Kaeppler H, Rhee Y (2000) Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Mol Biol* 43:179–188
- Kakutani T, Munakata K, Richards EJ, Hiroshika H (1999) Meiotically and mitotically stable inheritance of DNA hypomethylation induced by ddm1 mutation of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 151: 831–838
- Kalisz S, Purugganan D (2004) Epialleles via DNA methylation: consequences for plant evolution. *Trends Ecol Evol* 19:309–314
- Laird PW (2003) The power and the promise of DNA methylation markers. *Nature Reviews Cancer* 3:253–264
- Lambé P, Mutambel H, Fouche J, Deltour R, Foidart J, Gaspar T (1997) DNA methylation as a key process in regulation of organogenic totipotency and plant neoplastic progression?, *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 33:155–162
- Lippman Z, Gendrel A-V, Colot V, Martienssen R (2005) Profiling DNA methylation patterns using genomic tiling microarrays. *Nature Meth* 2:219–224
- Loidl P (2004) A plant dialect of the histone language. *Trends Plant Sci* 9:84–90

- Martienssen RA, Doerge RW, Colot V (2005) Epigenomic mapping in *Arabidopsis* using tiling microarrays. *Chrom Res* 13:299–308
- Matsuyama T, Abe T, Bae C-H, Takahashi Y, Kiucchi R, Nakano T, Asami T, Yoshida S (2000) Adaptation of restriction landmark genomic scanning (RLGS) to plant genome analysis. *Plant Mol Biol Report* 18:331–338
- Matsuyama T, Kimura M, Koike K, Abe T, Nakano T, Asami T, Ebisuzaki T, Held W, Yoshida S, Nagase H (2003) Global methylation screening in the *Arabidopsis thaliana* and *Mus musculus* genome: Applications of virtual image restriction landmark genomic scanning (Vi-RLGS). *Nucl Ac Res* 31:4490–4496
- Meyer P (2001) Chromatin remodelling. *Curr Opin Plant Biol* 4:457–462
- Mills K, Ramsahoye B (2002) DNA methylation protocols: methods in molecular biology. Humana Press, New Jersey, pp 1–189
- Moore T (2001) Southern analysis using methyl-sensitive restriction enzymes. *Methods Mol Biol* 181:193–203
- Ogino S, Kawasaki T, Brahmandan M, Cantor M, Kirkner GJ, Spielgelman D, Makrigiorgos GM, Weisenberger DJ, Laird PW, Loda M, Fuchs CS (2006) Precision and performance characteristics of bisulfite conversion and real-time PCR (MethylLight) for quantitative DNA methylation analysis. *J Mol Diagn* 8:209–217
- Pflieger S, Lefebvre V, Causse M (2001) The candidate gene approach in plant genetics: a review, *Mol Breed* 7:275–291
- Pigliucci M (2001) Phenotypic plasticity: beyond nature and nurture. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland, USA
- Pigliucci M (1998) Developmental phenotypic plasticity: where internal programming meets the external environment. *Curr Opin Plant Biol* 1:87–91
- Robertson KD (2005) DNA methylation and human disease. *Genetics* 6:597–610
- Ronemus M, Galbiati M, Ticknor C, Chen J, Dellaporta S (1996) Demethylation-induced developmental pleiotropy in *Arabidopsis*. *Science* 273:654–657
- Rush L, Plass C (2002) Restriction landmark genomic scanning for DNA methylation in cancer: past, present and futures applications. *Anal Biochem* 307:191–201
- Salszberg A, Fisher O, Siman-Tov R, Ankrí S (2004) Identification of methylated sequences in genomic DNA of adult *Drosophila melanogaster*. *Biochem Biophys Res Comm* 322:465–469
- Shiraishi M, Oates AJ, Li X, Chuu YH, Sekiya T (2004a) Segregation of partly melted molecules: isolation of CpG islands by polyacrylamide gel electrophoresis. *Biol Chem* 385:967–973
- Shiraishi M, Sekiguchi A, Oates AJ, Terry MJ, Miyamoto Y, Sekiya T (2004b) Methyl-CpG binding domain column chromatography as a tool for the analysis of genomic DNA methylation, *Anal Biochem* 329:1–10
- Shiraishi M, Sekiguchi A, Oates AJ, Terry MJ, Miyamoto Y, Tanaka K, Sekiya T (2002) Variable estimation of genomic DNA methylation: a comparison of methyl-CpG binding domain column chromatography and bisulfite genomic sequencing. *Anal Biochem* 380:182–185
- Takamiya T, Hosobuchi S, Asai K, Nakamura E, Tomioka K, Kawase M, Kakutani T, Paterson AH, Murakami Y, Okuizumi H (2006) Restriction landmark genome scanning method using isoschizomers (*MspI/HpaII*) for DNA methylation analysis. *Electrophoresis* 27:2846–2856
- Tariq M, Paszkowski J (2004) DNA and histone methylation in plants. *Trends Genet* 6:244–251
- Tsaftaris AS, Polidoros AN, Koumproglou R, Tani A, Kovacevic N, Abatzizou E (2005) Epigenetic mechanisms in plant and their implications in plant breeding. In: Tuberosa R, Phillips RL, Gale MA (eds) In the wake of the double helix: from the green revolution to the gene revolution. Avenue Media, Bologna, Italy, pp 157–172
- Varshney RK, Graner A, Sorrells M (2005) Genomic-Assisted breeding for crop improvement, *Trends Plant Sci* 10:621–630
- Vongs A, Kakutani T, Martienssen R, Richards E (1993) *Arabidopsis thaliana* DNA methylation mutants. *Science* 260:1926–1928
- Wirtz M, Schumann CA, Schellentrager M, Gab S, Vom Brocke J, Podeschwa MA, Altenbach HJ, Oscier D, Schmitz OJ (2005) Capillary electrophoresis-laser induced fluorescence analysis of endogenous damage in mitochondrial and genomic DNA. *Electrophoresis* 26:2599–2607

- Wu R, Ma C-Z, Zhu J, Casella G (2002) Mapping epigenetic quantitative trait loci (QTL) altering a developmental trajectory. *Genome* 45:28–33
- Xiong Z, Laird PW (1997) COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucl Ac Res* 25:2532–2534
- Xiong LZ, Xu CG, Saghai Maroof MA, Zhang Q (1999) Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Mol Gen Genet* 261:439–446
- Yu L, Liu C, Bennett K, Wu YZ, Dai Z, Vandeusen J, Opavsky R, Raval A, Trikha P, Rodriguez B, Becknell B, Mao C, Lee S, Davuluri RV, Leone G, Van den Veyer IB, Caligiuri MA, Plass C (2004) A *Not I-EcoRV* promoter library for studies of genetic and epigenetic alterations in mouse models of human malignancies. *Genomics* 84:647–660
- Zilberman D, Henikoff S (2005) Epigenetic inheritance in *Arabidopsis*: selective silence. *Curr Opin Genet Dev* 15:557–562

**Tableau 4.** Méthodes actuelles permettant une analyse à haut débit de la méthylation de l'ADN (d'après Suzuki et Bird, 2008)

Readout method	Sample pretreatment method	General basis	Resolution	Other features	Uses
<i>DNA microarrays</i>					
Oligonucleotide arrays	Bisulphite conversion, methylation-sensitive restriction enzyme or affinity purification methods	Short (25-mer) or long (60-mer) oligonucleotide array	Moderate	–	Tiling genomic arrays, promoter arrays and custom arrays
SNP arrays		SNP selective probe array	Moderate	–	Detection of allele-specific DNA methylation
BeadArray (Illumina)	Bisulphite conversion	Ratio of the methylated and unmethylated PCR products is determined at single CpG sites	High: single-base resolution, quantitative	A large set of primers needs to be designed	Detection of methylation polymorphisms (96 samples assayed in parallel)
<i>Sequencing</i>					
Standard sequencing	Bisulphite conversion	Sanger sequencing	High: single-base resolution, quantitative	–	Expensive and labour intensive for genome-wide analysis
Direct large-scale sequencing	Bisulphite conversion, methylation-sensitive restriction enzyme or affinity purification methods	Short-read sequencing (Solexa sequencing: 40 million reads of 25–35 bases; 454 sequencing: 400,000 reads of >100 bases)	High: single-base resolution, quantitative	High-quality reference sequence is required	Fast and relatively inexpensive. Genotype information can be obtained simultaneously



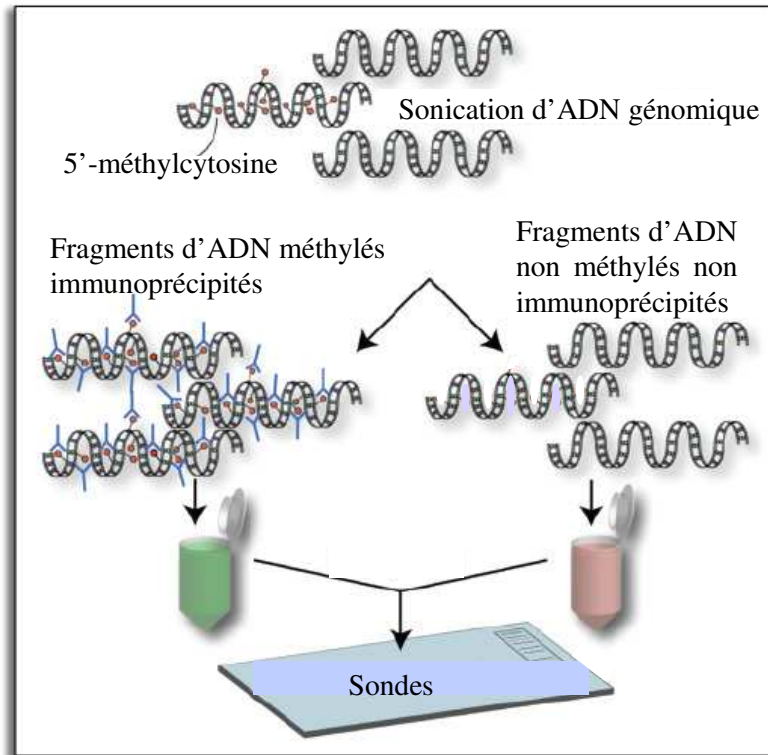
**Figure 26.** Schéma représentant la méthode de "McrBC arrays" pour la détection de séquences d'ADN méthylées (d'après Lippman *et al.*, 2005)

### 3. Compléments pour l'étude des marques épigénétiques à l'échelle du génome : le cas du méthylome de l'ADN

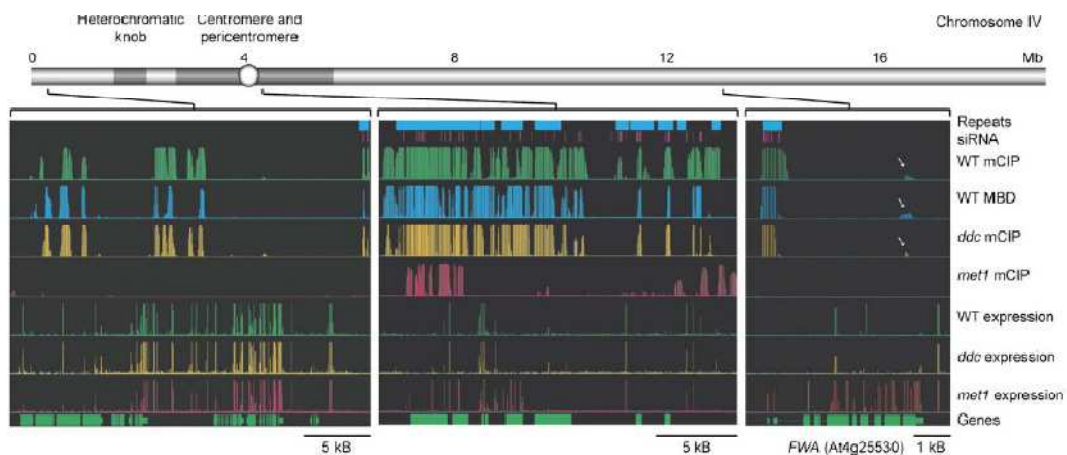
En plus des techniques précédemment décrites dans la publication n°1 (Table I), de nouvelles méthodes permettant une identification à haut débit et à l'échelle du génome des marques épigénétiques sont maintenant disponibles (Tableau 4). Nous présenterons ici deux méthodes à titre d'exemple qui ont été utilisées pour réaliser la caractérisation du méthylome chez *Arabidopsis*.

#### 3.1. "McrBC arrays"

L'ADN génomique extrait est fragmenté par nébulisation (Figure 26 ; Lippman *et al.*, 2005). L'ADN est ensuite divisé en deux lots égaux. L'un des lots est traité par l'endonucléase McrBC. Cette endonucléase coupe l'ADN simple brin ou double brin au niveau des cytosines méthylées. Les fragments d'ADN supérieurs à 1 kpb sont purifiés par gel pour les deux échantillonnages d'ADN traité et non traité par McrBC, puis marqués par les fluorochromes vert et rouge, respectivement Cy3 et Cy5. Les deux lots sont ensuite mélangés et hybridés sur une puce à ADN sur laquelle est fixée l'ADN génomique total. Les ADN fluorescents vont ainsi s'hybrider sur les gènes déposés. Chaque spot est excité par un laser et l'émission de fluorescence est mesurée *via* un photomultiplicateur. On obtient alors deux images dont le niveau de vert pour la première et le niveau de rouge pour la seconde sont détectés et superposés. On obtient alors une image avec des spots verts (fragments non méthylés), des spots rouges (fragments totalement méthylés) et des spots jaunes (fragments présentant un niveau intermédiaire de méthylation). L'intensité du signal à la longueur d'onde d'émission du fluorochrome vert et l'intensité du signal à la longueur d'onde du fluorochrome rouge sont mesurées. Puis le ratio intensité du fluorochrome rouge/ intensité du fluorochrome vert est calculé. Ainsi, si ce ratio est supérieur à 1 la séquence est méthylée.



**Figure 27.** Schéma représentant la méthode de "ChIP tiling microarrays" pour la détection de séquences d'ADN méthylées. L'ADN génomique est fragmenté par sonication en séquences de tailles comprises entre 300 et 1000 pb. Des anticorps anti-5-méthylcytosine sont utilisés pour immunoprécipiter les fragments d'ADN méthylés et ne se fixeront pas sur les fragments d'ADN non méthylés. Les deux échantillons sont marqués différemment puis sont cohybridés sur la puce à ADN. L'intensité relative du signal au niveau de chaque spot indique l'état de méthylation de la séquence correspondante (d'après Gregory *et al.*, 2008).



**Figure 28.** Profils de méthylation et d'expression d'une région d'euchromatine (439 000 - 468 000 pb ; à gauche), d'une région riche en séquences répétées située au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique (4 827 000 - 4 849 500 pb, au milieu) et du gène FWA (13 038 000 - 13 043 000 pb, à droite) situé sur le chromosome 4 d'*Arabidopsis*. Les flèches blanches indiquent la détection de sites CG méthylés à proximité de l'extrémité 3' de FWA. Une représentation schématique du chromosome 4 est située en haut de la figure. *ddc* = *drm1 drm2 cmt3* triple mutant (d'après Zhang *et al.*, 2006).

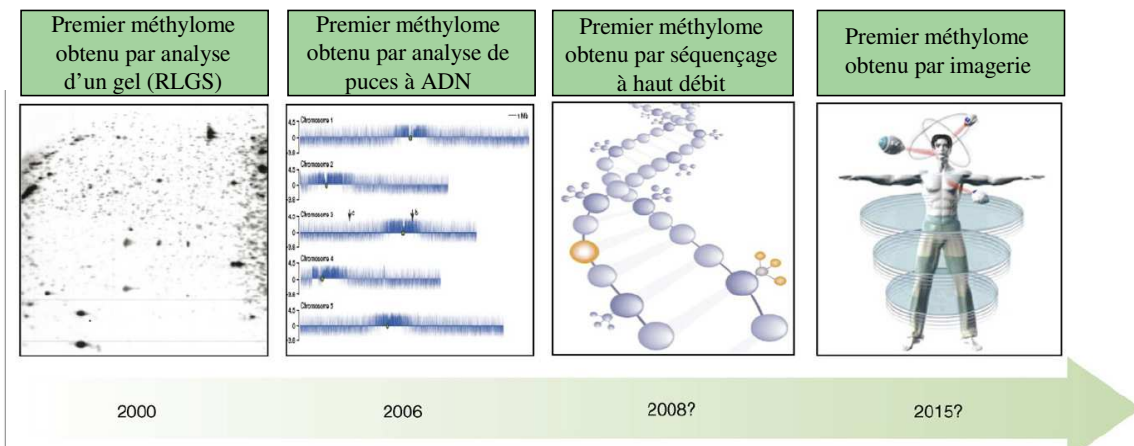


### 3.2. "ChIP tiling microarrays"

L'ADN génomique extrait est fragmenté par sonication (Figure 27) (Zhang *et al.*, 2006 ; Zilberman *et al.*, 2007 ; Gregory *et al.*, 2008). Les régions méthylées sont ensuite immunoprécipitées à l'aide d'anticorps dirigés contre les 5-méthylcytosines. Après immunoprécipitation, les fragments d'ADN sont amplifiés afin d'obtenir une plus grande quantité d'ADN avant de pouvoir réaliser l'hybridation sur le "tiling microarrays" réalisé avec le génome d'*Arabidopsis*. L'ADN amplifié est traité brièvement à la Dnase I pour réduire encore la taille des molécules et améliorer l'hybridation. Les fragments (cibles) sont ensuite marqués par dUTP et ddUTP biotinylés, puis purifiés à l'aide d'une colonne d'affinité excluant les fragments de tailles trop petites ou trop grandes. Les cibles sont ensuite hybridées sur le "tiling microarrays".

L'application de cette méthode a notamment permis l'analyse comparative du profil de méthylation et d'expression de plusieurs régions du chromosome 4 d' *Arabidopsis* (Figure 28).

Ainsi, après la découverte de la cytosine il y a plus de 60 ans, la découverte du rôle de la méthylation de l'ADN dans la régulation de l'expression des gènes, l'analyse du profil de méthylation au niveau de loci, la caractérisation du méthylome à l'échelle d'un génome est possible et a été déjà réalisée chez des espèces végétales telles que *Arabidopsis* et le riz. La mise au point d'une telle technique ouvre ainsi de nouvelles perspectives. L'identification des méthylomes chez des organismes possédant de plus grands génomes tels que celui de l'homme ou d'autres mammifères peut maintenant être envisagée (Figure 29). Une identification à très haut débit des loci méthylés qui pourraient être des biomarqueurs d'intérêt peut être envisagée. En outre, les comparaisons entre méthylomes et transcriptomes pourront permettre de continuer le décryptage du rôle de la méthylation dans la régulation des gènes.



**Figure 29.** Méthodes d'analyses du méthylome passées et futures, pour des applications courantes ou possibles dans un futur proche (d'après Beck et Rakyant, 2008).

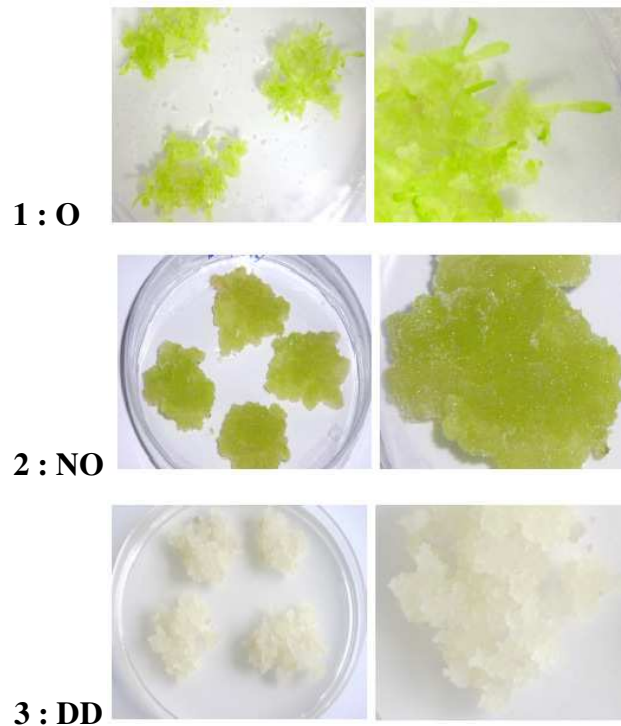
#### 4. Application à la morphogenèse *in vitro* chez la betterave sucrière (publication n°2)

L'objectif de recherche du laboratoire dans lequel s'est également inscrit mon projet de thèse, est de mieux comprendre le rôle des mécanismes épigénétiques lors de la morphogenèse et de rechercher des biomarqueurs potentiels. Le système expérimental utilisé correspond à la betterave sucrière (voir introduction générale). La partie suivante résume les travaux réalisés dans ce cadre au début de ma thèse (suite de la thèse de Mlle Adisa Causevic, 2005) sur trois lignées cellulaires *in vitro* de betterave sucrière permettant une modélisation simple d'un système de morphogenèse végétative.

Plusieurs travaux ont mis en évidence, dans différents systèmes expérimentaux végétaux aussi variés que la morphogenèse *in vitro* ou la germination de semences, un lien entre le potentiel de morphogenèse et des variations de méthylation de l'ADN (Lambé *et al.*, 1997 ; Causevic *et al.*, 2005 ; Nakabayashi *et al.*, 2005 ; Peredo *et al.*, 2006). Cependant, la plasticité morphogène n'a jamais été clairement corrélée à des paramètres épigénétiques. De plus, les loci cibles de ces variations sont peu connus et n'ont jamais été utilisés comme marqueurs moléculaires de la morphogenèse (Gentil et Maury, 2007). Des travaux ont donc été menés sur trois lignées cellulaires de betterave sucrière : une lignée Organogène (nommée O), une lignée Non Organogène (nommée NO) et une lignée Dédifférenciée (nommée DD), issues de la même plante mère (Figure 30 ; Causevic *et al.*, 2005).

Ces trois lignées ont été obtenues à partir de la même plante mère et présentent différents états de différenciation cellulaire. La lignée O est différenciée, organogène, associée à une régénération continue de tiges feuillées et photosynthétiquement active. La lignée NO est différenciée mais non organogène et photosynthétiquement active. Enfin, la lignée DD est dédifférenciée, déficiente en chlorophylle et présente une architecture pariétale anormale (Hagège *et al.*, 1991c). Depuis 1978, des investigations poussées ont été réalisées et plus particulièrement sur les lignées NO et DD. En raison de leurs différences au niveau morphologique, cytologique et biochimique, ces lignées sont considérées comme constituant un système expérimental intéressant pour l'étude de la morphogenèse *in vitro*.

Des analyses cytologiques et ultrastructurales (Hagège *et al.*, 1991a) montrent que la lignée DD, auxine et cytokine indépendante, est apparemment incapable de croître et de se différencier comparativement à la lignée NO, auxine et cytokinine dépendante.



**Figure 30.** Phénotypes des lignées cellulaires de betterave sucrière : 1, lignée organogène 'O' ; 2, lignée non organogène 'NO' ; 3, lignée dédifférenciée 'DD' (d'après Causevic *et al.*, 2006).

Les cellules DD sont caractérisées par une architecture pariétale anormale, constituée de quelques polysaccharides organisés en bandes parallèles lâches dans une matrice amorphe. L'étude de la composition de la paroi cellulaire révèle une absence de lignine et un déficit en acide férulique (un précurseur des monomères de lignine) et en cellulose (Crèveœur *et al.*, 1987 ; Hagège *et al.*, 1991a ; Hagège *et al.*, 1991c). Des analyses biochimiques ont mis en évidence de très faibles activités peroxydase chez la lignée DD en comparaison à la lignée NO (Gaspar *et al.*, 1988 ; Hagège *et al.*, 1991a). Les peroxydases sont connues pour participer à la formation de la paroi en favorisant la polymérisation des monomères de lignine. De plus, une très faible activité catalase, mais des activités élevées superoxide dismutase, glutathion réductase, ascorbate peroxydase, monodeshydroascorbate et deshydroascorbate réductases ont également été détectées dans la lignée DD comparativement à la lignée NO.

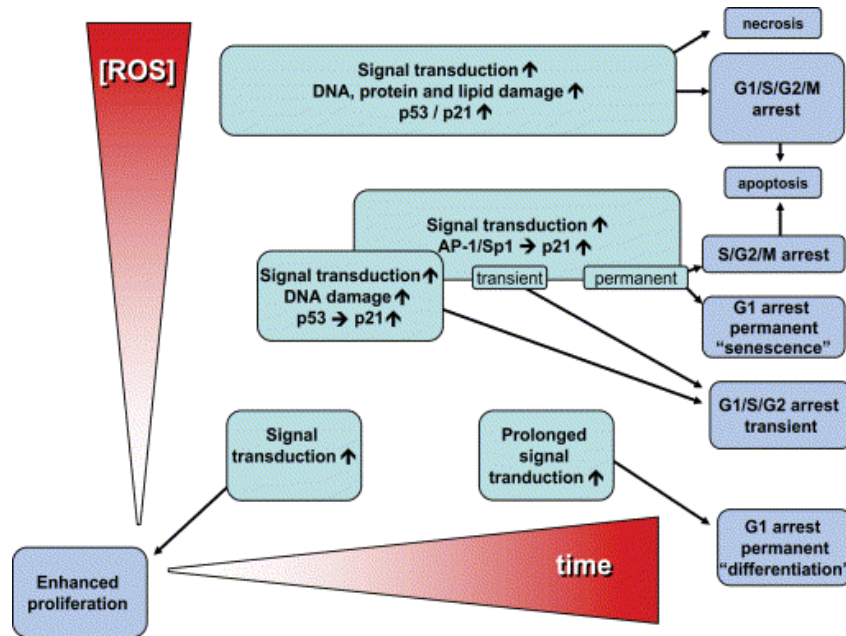
En outre, la production d'éthylène, qui contrôle les enzymes de la synthèse pariétale était très faible dans la lignée DD (Hagège *et al.*, 1991b). L'ensemble de ces données suggère que la lignée DD a subi un stress oxydant. Contrairement aux lignées NO et DD, peu de données sont disponibles concernant la lignée O.

Ce système de cultures *in vitro* de cellules de betterave sucrière présentant des stades distincts de différenciation cellulaire était ainsi disponible au laboratoire avant mon arrivée

(Hagège *et al.*, 1991 ; Hagège *et al.*, 1992 ; Cerrié *et al.*, 1994 ; Hagège, 1996). Ce système, simple d'utilisation, permet d'apprécier l'effet de divers traitements hypo- ou hyperméthylants de l'ADN dans des conditions environnementales "stables" sur la morphogenèse *in vitro* et de réaliser divers tests biochimiques ou moléculaires pour caractériser les variations phénotypiques obtenues sans variation du génotype. Ce système permet d'étudier la morphogenèse de cette plante, ce qui est une étape fondamentale pour sa régénération *in vitro*. Pour caractériser les changements phénotypiques, deux processus cellulaires associés à l'état de différenciation de la cellule végétale ont été suivis :

- la différenciation de la paroi cellulaire (Causevic, 2005 ; Causevic *et al.*, 2005). En particulier, la lignification de la paroi est clairement associée à l'arrêt de la croissance et l'état de différenciation de la cellule elle-même (Campbell et Sederoff, 1996 ; Musel *et al.*, 1997 ; Gonzalez *et al.*, 1999 ; Schopfer, 2001 ; MacAdam et Grabber, 2002 ). Ainsi, différents paramètres biochimiques comme l'activité des peroxydases et les teneurs en composés phénoliques pariétaux ont été mesurés dans la collection de lignées cellulaires traitées. En parallèle de cette étude, les niveaux des paramètres épigénétiques, cibles des traitements décrits précédemment ont également été déterminés. Une telle analyse sur une large collection d'échantillons a permis d'établir une corrélation entre tous ces paramètres.

- l'état redox de la cellule qui est également clairement associé à l'état de différenciation de la cellule (Figure 31) (Sauer *et al.*, 2001 ; Boonstra et Post, 2004 ; Edreva, 2005). Certains des paramètres de protection avaient déjà été étudiés chez les lignées cellulaires de betterave sucrière (Crèveœur *et al.*, 1987 ; Hagège *et al.*, 1990 ; Crèveœur *et al.*, 1992 ; Hagège *et al.*, 1992). Une étude détaillée de l'état redox des lignées cellulaires traitées, comprenant le contenu en formes activées de l'oxygène, les marques de dommages oxydatifs membranaires et les systèmes antioxydants enzymatiques ou non, a été entreprise pour tenter d'établir une corrélation avec l'état de différenciation des cellules *in vitro* et les niveaux des paramètres épigénétiques.



**Figure 31** : Schéma représentant la multitude des effets des formes activées de l'oxygène (Reactive oxygen species ou "ROS") sur la progression du cycle cellulaire et la différenciation ou la prolifération cellulaire (d'après Boonstra et Post, 2004).

Cette validation permet alors d'envisager la recherche des loci cibles des remaniements de la méthylation de l'ADN qui seraient potentiellement impliqués dans la morphogenèse. De telles séquences présenteraient un potentiel comme biomarqueurs de ce processus. Ce travail et les résultats sont présentés dans la **publication n°2** ci-après. Dans un premier temps, l'état de différenciation cellulaire des lignées a été caractérisé par la mesure du taux de 36 paramètres biochimiques définissant l'état d'oxydoréduction de la cellule. Puis, les taux de méthylation de l'ADN, d'acétylation des histones et des activités enzymatiques correspondantes seront définis pour les trois lignées cellulaires. Des corrélations statistiques ont été établies entre les paramètres épigénétiques et l'état de différenciation cellulaire des lignées. La méthode "Restriction Landmark Genome Scanning" (RLGS, voir Figure 3 **publication n°1**) a été appliquée afin d'identifier les loci cibles des modifications de la méthylation de l'ADN. Cette technique consiste à digérer de l'ADN génomique par des enzymes de restriction sensibles à la méthylation pour obtenir des fragments dont les extrémités méthylées seront marquées radioactivement. Ces fragments migrent ensuite sur un gel d'agarose, puis sont digérés une seconde fois afin de diminuer leur taille. Après une deuxième électrophorèse sur gel d'acrylamide, les fragments sont révélés par autoradiographie. Enfin, le profil de méthylation de ces loci dans les 3 lignées cellulaires a été déterminé par un séquençage au bisulfite.

**Publication n°2** : Causevic\*, A., **Gentil\***, M.-V., Delaunay, A., El Soud, W., Garcia, Z., Pannetier, C., Brignolas, F., Hagège, D., and Maury, S. (2006). Relationship between DNA methylation and histone acetylation levels, cell redox and cell differentiation states in sugarbeet lines. **Planta** 224, 812-827.

IF : 3,113. \* : Ces auteurs ont contribué de manière équivalente au travail.



Adisa Causevic · Marie-Véronique Gentil  
Alain Delaunay · Walid Abu El-Soud · Zacarias Garcia  
Christophe Pannetier · Franck Brignolas · Daniel Hagège  
Stéphane Maury

## Relationship between DNA methylation and histone acetylation levels, cell redox and cell differentiation states in sugarbeet lines

Received: 28 December 2005 / Accepted: 8 March 2006  
© Springer-Verlag 2006

**Abstract** In order to evaluate the permanent chromatin remodeling in plant allowing their high developmental plasticity, three sugarbeet cell lines (*Beta vulgaris* L. *altissima*) originating from the same mother plant and exhibiting graduate states of differentiation were analyzed. Cell differentiation has been estimated by the cell redox state characterized by 36 biochemical parameters as reactive oxygen species steady-state levels, peroxidation product contents and enzymatic or non-enzymatic protective systems. Chromatin remodeling has been estimated by the measurement of levels of DNA methylation, histone acetylation and corresponding enzyme

activities that were shown to differ between cell lines. Furthermore, distinct loci related to proteins involved in cell cycle, gene expression regulation and cell redox state were shown by restriction landmark genome scanning or bisulfite sequencing to display differential methylation states in relation to the morphogenic capacity of the lines. DNA methylating, demethylating and/or histone acetylating treatments allowed to generate a collection of sugarbeet cell lines differing by their phenotypes (from organogenic to dedifferentiated), methylcytosine percentages (from 15.0 to 43.5%) and acetylated histone ratios (from 0.37 to 0.52). Correlations between methylcytosine or acetylated histone contents and levels of various parameters (23 or 7, respectively, out of 36) of the cell redox state could be established. These data lead to the identification of biomarkers of sugarbeet morphogenesis in vitro under epigenetic regulation and provide evidence for a connection between plant morphogenesis in vitro, cell redox state and epigenetic mechanisms.

**Electronic Supplementary Material** Supplementary material is available for this article at <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-006-0267-3> and is accessible for authorized users.

A. Causevic and M.-V. Gentil contributed equally to this work.

A. Causevic · M.-V. Gentil · A. Delaunay · F. Brignolas  
D. Hagège · S. Maury (✉)  
Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures,  
Faculté des sciences, Université d'Orléans, UPRES EA 1207,  
rue de Chartres, BP 6759, 45067 Orléans Cedex 2, France  
E-mail: stephane.maury@univ-orleans.fr  
Tel.: +33-2-38417022  
Fax: +33-2-38417022

A. Causevic  
Department of Biology, University of Sarajevo,  
71000 Sarajevo, Bosnia-Herzegovina

A. Causevic  
Institute for Genetic Engineering and Biotechnology,  
71000 Sarajevo, Bosnia-Herzegovina

W. A. El-Soud  
Division of Molecular Biology, Biocenter,  
Innsbruck Medical University, Fritz-Pregl-Str. 3,  
6020 Innsbruck, Austria

Z. Garcia · C. Pannetier  
Institut Pasteur, 25 rue du docteur Roux,  
75724 Paris Cedex 15, France

**Keywords** Antioxidant · Histone acetylation · Methylcytosine · Morphogenesis · Epigenetic · Sugarbeet (*Beta vulgaris* L. *altissima*)

**Abbreviations** APX: Ascorbate peroxidase · CAT: Catalase · DD: Dedifferentiated callus line · DHAR: Dehydroascorbate reductase · DNMT: DNA methyltransferase · GR: Glutathione reductase · GSH: Reduced glutathione · GSSG: Oxidized glutathione · HDAC: Histone deacetylase · HPLC: High-performance liquid chromatography · LC-MS: Liquid chromatography-mass spectrometry · mC: Methylcytosine · MDAR: Monodehydroascorbate reductase · NEAOP: Non-enzymatic antioxidant properties · NO: Non-organogenic callus line · O: Organogenic callus line · PCA: Perchloric acid · PMSF: Phenylmethanesulfonyl fluoride · RLGS: Restriction landmark genome scanning · ROS: Reactive oxygen species · SE: Standard error · SOD: Superoxide dismutase · TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances



## Introduction

Most structures in mature plants can acclimate to the environment by delaying or advancing growth and differentiation (Pigliucci 2001). This plant developmental plasticity could be achieved by reversible gene repression mechanisms. DNA methylation and histone deacetylation induce chromatin remodeling in both animals and plants and modulate genome expression playing an important role in various physiological processes (Nakao 2001). Nevertheless, due to the high developmental plasticity of plants as compared to animals, it is expected that the regulation of chromatin structure and function would be characterized by many distinct features (Lusser et al. 2001; Loidl 2004). Thus, in plants DNA methylation can persist throughout development and be inherited between generations and corresponds to the addition of methyl group to cytosine nucleotides at CpG but also at Cp(N)pG sequences (where N could be any nucleotide) in DNA. This reaction is catalyzed by three DNA methyltransferases families (DNMT; EC 2.1.37): DNMT1-like maintenance methyltransferases, domains rearranged de novo methyltransferases and the plant-specific chromomethyltransferases (Finnegan and Kovac 2000). Crystallographic structural analysis revealed that the free N-terminal tails of the core histones protrude from the core octamer protein and are subjected to various posttranslational modifications, including acetylation, phosphorylation and methylation (Loidl 2004). All these modifications constitute a code as proposed in the histone code model, with more combinatorial possibilities in plants. Histone deacetylation corresponds to the removal of acetyl group from lysine  $\epsilon$ -amino groups and is catalyzed by three main histone deacetylases families (HDAC; EC 3.5.1): the RPD3/HDA1 superfamily, the silent information regulator 2 (SIR2) family and the plant-specific HD2 family (Graessle et al. 2001; Lusser et al. 2001; Loidl 2004). RPD3/HDA1-like HDACs are found in all eukaryotic genomes. The SIR2 family of HDACs, present in all kingdoms of life, is distinctive in that it has no structural similarity to other HDACs and requires NAD as a cofactor. The third family, the HD2-type HDACs, was first identified in maize and appears to be present only in plants. In maize, four biochemically distinct HDAC activities have been identified: HD1A, HD1BI and II and HD2 (Lusser et al. 2001; Loidl 2004). This classification refers to chromatographic behavior, subcellular localization and enzymatic properties of the respective protein complexes. Two of these classes (HD1A and HD1B) show homology with yeast and mammalian proteins—RPD3 transcriptional repressor and HDA1 co-repressor (Graessle et al. 2001)—and are expressed in all maize organs but with variations during development. HD1A is loosely associated with chromatin and catalytically regulated by phosphorylation and specifically regulated in maize by limited proteolysis (Lusser et al. 2001; Pipal et al. 2003; Loidl 2004). HD1B

were shown to physically interact and cooperate with retinoblasta-related protein. This complex represses gene transcription in animals and is the sole in maize able to deacetylate the characteristic diacetylation pattern introduced by HATB on H4 histone (Lusser et al. 2001). The third class of plant HDAC (HD2), unique to plants, is a tightly chromatin-bound phosphoprotein, composed of three acidic polypeptides located in the nucleolus (Lusser et al. 2001; Loidl 2004). HD2 may be involved in the regulation of rRNA genes. The isolation of cDNAs encoding histone deacetylases of *Arabidopsis* has enabled to demonstrate the role of histone acetylation in plant development using a reverse genetic approach (Lusser et al. 2001; Loidl 2004). DNA methylation and histone deacetylation work in combination to regulate gene transcription (*Arabidopsis* genome initiative 2000; Dobosy and Selker 2001; Lusser et al. 2001; Nakao 2001; Loidl 2004). The presence of methylcytosine in sequences would alter the binding of transcriptional factors or other proteins to DNA. Another possibility, as it has been shown in animals, would be to attract proteins known as methyl-binding proteins that could recruit complexes containing histone deacetylases and that affect chromatin architecture. The histone deacetylation might modify interactions between histone octamers and DNA or proteins and might interfere with the higher order packing of chromatin (Lusser et al. 2001). Thus, high methylcytosine contents and low histone acetylation are frequently associated with silent genes.

Several specificities of plant systems concern the dialect of the chromatin language (Loidl 2004). However, only few data about plant developmental plasticity with phenotypic changes and quantitative variations of epigenetic parameters are available (Lambé et al. 1997; Joyce et al. 2003; Causevic et al. 2005; Law and Suttle 2005). The lack of adapted experimental systems and the difficulty to define biochemical markers associated to the phenotypical changes could explain this lack of data. In the present work, an experimental system composed of three in vitro sugarbeet callus lines originating from the same mother plant and exhibiting different states of differentiation was used. One line is organogenic (O) with continuous production of leafy shoot and is photosynthetically active. Another line is non-organogenic (NO) and photosynthetically active. A last line is dedifferentiated (DD), with chlorophyll deficiency and exhibits an abnormal cell wall architecture (Hagège et al. 1991; Causevic et al. 2005). Recently, we have demonstrated a relationship between phenotypes of these cell lines, their lignification during cell differentiation and their DNA methylation levels (Causevic et al. 2005). Previous reports on cellular redox state parameters have been published in other independent works only for the DD and NO lines and have revealed an oxidative stress state in the DD line (Hagège et al. 1992; Cerrie et al. 1994; Cherif et al. 1996; Hagège 1996). These cell lines represent an interesting model for the study of plant morphogenesis; and reactive oxygen species (ROS) are believed

to play an important role as intracellular messengers during morphogenesis (Sauer et al. 2001; Boonstra and Post 2004; Mittler et al. 2004; Edreva 2005). Our aims were to (1) characterize the cell redox state in these three lines with distinct morphogenetic properties by measuring 36 cell redox state parameters; (2) define the levels of some epigenetic parameters as DNA methylation and histone acetylation in these lines; (3) identify biomarkers of morphogenesis under differential epigenetic regulation; and (4) obtain, through treatments, a collection of sugarbeet lines with various phenotypes and levels of epigenetic parameters to establish relationships between cell redox state and DNA methylation or histone acetylation. All the data reported here demonstrate a dynamic connection between plant in vitro morphogenesis, cell redox state and epigenetic parameters.

## Materials and methods

### Plant material, growth conditions and treatments

Three sugarbeet (*Beta vulgaris* L. *altissima* cultivar F3S52 from SES-EUROPE, Tienen, Belgium) callus lines (O, NO and DD, respectively), originated from the same mother plant, were cultivated in vitro (Hagège et al. 1991). Cell lines were grown in a growth chamber at 22°C, under a 16 h photoperiod (700  $\mu\text{M m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Treatments with 5-azacytidine (10 or 100  $\mu\text{M}$ ), hydroxyurea (10 or 100  $\mu\text{M}$ ) and trichostatin A (1 or 10  $\mu\text{M}$ ) (Sigma) were performed in four replicates. Samples were collected at days 0, 14 and 21 of culture, weighed for growth analysis, frozen in liquid nitrogen or lyophilized; and stored at  $-80^\circ\text{C}$ .

### Determination of ROS steady-state level

Lyophilized calli (250 mg fresh weight) were homogenized in distilled water. Supernatants were collected by microcentrifugation of the crude extract. Total indirect ROS concentration was determined twice in four replicates, using Bioxytech  $\text{H}_2\text{O}_2$ -560 assay kit (TEBU-BIO, Le Perray en Yvelines, France), according to manufacturer recommendation. This assay is based on the oxidation of ferrous ion ( $\text{Fe}^{2+}$ ) to ferric ion ( $\text{Fe}^{3+}$ ) by ROS under acidic conditions. The ferric ion binds with indicator dye xylenol orange to form a stable colored complex, which can be detected at 560 nm.  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0–100  $\mu\text{M}$ ) was used as a standard reference.

### Extraction and quantification of peroxidation products of membrane lipids

Lipid hydroperoxides and conjugated dienes were analyzed as previously described (Cherif et al. 1996). For determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARs; including malondialdehyde) the method of Franck et al. (1998) was used.

### Determination of non-enzymatic protective compounds and pigments

All high-performance liquid chromatography (HPLC) analyses were performed using C18 column (X-terra, 4.6 cm  $\times$  15 cm, 5  $\mu\text{m}$ , INTERCHIM, Montluçon, France). The peaks were identified according to their retention time and spectra properties compared with commercial standards (Sigma). Ascorbate, dehydroascorbate and glutathione (oxidized and reduced) contents were determined according to Davey et al. (2003). The column was eluted at 2 ml  $\text{min}^{-1}$  with a 3 min linear gradient of 0–30% acetonitrile in a mobile phase consisting of 400 ml  $\text{l}^{-1}$  ortho-phosphoric acid, 0.1 mM EDTA and 0.25% methanol (v/v) adjusted to pH 2.5.  $\alpha$ -Tocopherol determination was done according to Leipner et al. (2000). Isocratic separation was done using methanol:acetonitrile:acetic acid (50:40:10, by vol) linear gradient from 0 to 13 min. The injection volume was 80  $\mu\text{l}$  and the flow rate was 1.5 ml  $\text{min}^{-1}$ . Absorbance was performed at 295 nm. Pigments extraction, HPLC separation and quantification were done according to Leipner et al. (2000). Detection of  $\beta$ -carotene, chlorophylls a and b by absorbance measurement was made at 445, 645 and 663 nm, respectively. For polyamines analysis, lyophilized material (250 mg of fresh weight) was extracted in 1 ml of 5% perchloric acid (PCA) (v/v) containing 5 mg  $\text{l}^{-1}$  diaminoheptane (w/v) as an internal standard. After 1 h of incubation at 4°C, samples were centrifuged at 12,000  $\times g$  for 5 min at 4°C. Supernatant and pellet were used separately. The supernatant was used in the determination of free and PCA-soluble conjugated polyamines, whereas the pellet was used to determine PCA-insoluble bound polyamines. For the extraction of PCA-soluble conjugated polyamines, 100  $\mu\text{l}$  of the supernatant was mixed with 12 N HCl (1:1, v/v). For the extraction of PCA-insoluble bound polyamines, the pellet was mixed with 6 N HCl (1:1, v/v). Both mixtures were heated for 10 h at 110°C and then centrifuged at 13,000  $\times g$  for 5 min at 4°C. All supernatants were then analyzed by HPLC and polyamines detected by absorbance measurement at 227 nm. For phenolic compounds extraction, sugarbeet calli were ground in ice-cold methanol. A volume of 5  $\mu\text{l}$  of gallic acid (0.5 mg  $\text{ml}^{-1}$ ) was added as internal standard for HPLC quantification. The methanol extracts were used directly for spectrophotometric quantification, as well as for non-enzymatic antioxidant properties (NEAOP) determination and LC-MS analyses. Quantities of oxidized  $\beta$ -carotene after 45 min in the presence ( $\beta_1$ ) or not ( $\beta_2$ ) of phenolic methanolic extracts of sugarbeet cells were estimated. NEAOP was calculated using the following formula:  $\text{NEAOP} = ((\beta_2 - \beta_1)/\beta_2) \times 100$ . An LC system of Thermo Separation Products equipped with a P1000XR pump, TSP AS1000XR autosampler and UV 6000LP detector was used. Separation was performed using a linear gradient with the following solvents: A, acidified water (with acetic acid), pH 3, and B, acetonitrile. Linear gradients were started with 80% A and 20% B (0–14 min), 70% A and 30% B (14–17 min),

60% A and 40% B (17–27 min), 0% A and 100% B (27–32 min). Flow rate was 2 ml min<sup>-1</sup> and column temperature was kept at 30°C. Injection volume was 10 µl. Mass spectra were acquired using a Thermo-Finnigan LCQ Deca mass spectrometer, equipped with an electrospray ion source. All mass spectra were acquired in the negative ion mode, scanning from *m/z* 150 to 600. Operating conditions were: sheath gas 65 psi; auxiliary gas (nitrogen) 10 psi; ESI needle voltage 4.5 kV; capillary temperature 250°C; capillary voltage -12 V. Compounds were introduced to the fused silica-lined ESI needle by syringe pump at 5 µl min<sup>-1</sup> flow rates. Data acquisition and processing were performed with Xcalibur software (version 1.2).

#### Determination of protective enzymes activities

Catalase (EC 1.11.1.6) activity was assayed by consumption of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> according to Hagège et al. (1992). The total activity of superoxide dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1) was determined from its capacity to inhibit reduction of tetrazolium blue by superoxide radicals (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). O<sub>2</sub><sup>-</sup> were generated by the xanthine-xanthine oxidase system according to the adapted method from Hagège et al. (1992). One SOD unit was taken as the amount of extract that gave 50% inhibition of reduction of tetrazolium blue. SOD isozymes were separated and identified on non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (Martinez et al. 2001). Peroxidase (EC 1.11.1.7) activity was determined using the procedure of Causevic et al. (2005). The activity of ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11) was determined by following the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent decomposition of ascorbate at 290 nm, according to the adapted method from Hodges and Forney (2000). Dehydroascorbate reductase (EC 1.8.5.1) activity was assayed by monitoring the increase in absorbance at 265 nm due to ascorbate formation according to the adapted method from Hodges and Forney (2000). Monodehydroascorbate reductase (EC 1.1.5.4) activity was measured as NADH oxidized per minute at 340 nm at 25°C (adapted method from Hodges and Forney 2000). Glutathione reductase (EC 1.6.4.2) activity was assayed as NADPH oxidized per minute at 340 nm at 25°C, according to the adapted method from Hodges and Forney (2000). Lipoxygenase (EC 1.13.11.12) activity was measured using linoleic acid as substrate, according to Cherif et al. (1996).

#### Restriction landmark genome scanning method for methylation

For restriction landmark genome scanning (RLGS) method, an adapted protocol from Costello et al. (2002) was applied. Genomic DNA, 1 µg µl<sup>-1</sup>, was treated with 26 U of Sequenase and 2 nM of each ddNTP (Invitrogen) to block the DNA extremities resulting from breakages during the purification process. This mixture was incubated at 37°C for 20 min and then at 70°C for 15 min to inactivate the enzyme. Dephosphorylation of

5' extremity of DNA fragment was done using 1 U of shrimp alkaline phosphatase at 37°C for 40 min and after at 70°C for 15 min. NotI (Invitrogen), 20 U, was added and the resulting mixture incubated at 37°C for 4 h. This enzyme allows DNA cleavage in one cytosine and guanine-rich palindrome site 5'GCGGCCGC3' but not if the internal cytosine is methylated. Restriction fragments were labeled with 26 U of Sequenase in the presence of 2.2 MBq [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dGTP (740 MBq ml<sup>-1</sup>, 225 TBq mM<sup>-1</sup>) and 1.5 MBq [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (370 MBq ml<sup>-1</sup>, 225 TBq mM<sup>-1</sup>) (ICN). After incubation at 37°C for 30 min, fragments were fractionated in the presence of 30 U of EcoRV (Sigma) for 3 h at 37°C. First dimension separation of restriction fragments was performed in 0.8% (w/v) SeaKem agarose gel in glass tubes (20 cm long and 3 mm diameter). Running buffer was 1 M Tris buffered at pH 8.2 supplemented with 360 mM NaCl, 400 mM sodium acetate and 40 mM EDTA. Migration was done at 200 V for 2 h, then at 230 V for 8 h. After migration, gels were removed from the glass tubes and washed two times for 10 min in 20 mM Tris-HCl buffered at pH 7.4, containing 100 mM MgCl<sub>2</sub> and 100 mM NaCl. DNA fragments were digested *in gel* with 800 U HinfI (Amersham) for 2 h at 37°C. Second dimension separation of restriction fragments was performed on 5% (w/w) polyacrylamide gel (acryl/bisacrylamide, 19:1) in gel slab (40×33 cm<sup>2</sup>). Migration was done at 100 V for 24 h in 89 mM Tris-HCl buffered at pH 8.3, containing 60 mM boric acid and 2 mM EDTA. After migration, second dimension gel was vacuum dried and exposed to autoradiographic film (KODAK biomax MS, Amersham). Spots were then cut from the gels, frozen and eluted in 10 mM Tris-HCl buffered at pH 8.0 containing 0.1 mM EDTA. Two nanograms of NotI and HinfI adapters per picogram of DNA (Promega) was used for ligation at the ends of these fragments using 10 U of *Escherichia coli* DNA ligase (Ozyme, St Quentin-en-Yvelines, France) one night at 16°C. Adapters were designed as follow: 5'ATTGCAGTTATAACA3' with 5'GGCCTGTATAACTGCAAT3' and 5'AGATCCGATGGTCATC3' with 5'ANTGATGACCATCGGATCT3' (with N = A, C, G or T). Primers (5'ATTGCAGTTATAACAGGCCGC3' and 5'AGATCGATGGTCATCANTC3', with N = A, C, G or T; Promega) were then, respectively, used in order to clone these sugarbeet genomic fragments by PCR using Red-Taq Genomic PCR kit (Sigma) and TOPOTA cloning kit (Invitrogen) recommendations. Sequencing was performed using the big-dye terminator v3.1 sequencing kit and carried out with a ABI 3100 automatic sequencer (PE Applied Biosystem, USA).

#### Analysis of cytosine methylation by HPLC, Southern blot and bisulfite PCR methods

Genomic DNA was extracted from frozen sugarbeet samples. Absolute methylation levels were measured by HPLC after enzymatic hydrolysis to degrade total genomic DNA, according to Causevic et al (2005). The

methylcytosine percentages were calculated using the following formula:  $\%mC = (mC / (C + mC)) \times 100$ , mC being the methylcytosine content and C the cytosine content. DNA methyltransferases (DNMT, EC 2.1.37) extraction and activity were performed as previously described (Causevic et al. 2005).

Methylation state of specific genomic sequences was investigated by Southern blot experiments using HpaII, PvuII or TaqI (Invitrogen) as previously described in Causevic et al (2005). Blotted nylon N<sup>+</sup> hybrid membranes were probed with sugarbeet SOD (0.6 kb, gift from Dr. M. McGrath), ascorbate peroxidase (0.6 kb) or catalase (0.4 kb) cDNA probes according to CDP-star kit recommendations (Amersham). For ascorbate peroxidase or catalase probes, the designed primers (Promega) were, respectively, used in order to clone sugarbeet genomic fragment by PCR using RedTaq Genomic PCR kit (Sigma) and TOPOTA cloning kit (Invitrogen) recommendations: 5'AAAGAGCAAAAAGGGACAAA3' and 5'CCCGA ACTATCTTATGGCGA3' or 5'TTCCCTGTGTTTTTC ATTCG3' and 5'CTCCAACAGGCTT TTCACTC3'.

In order to assess the pattern of methylation for sugarbeet genomic sequences (SOD and catalase genes), bisulfite sequencing was performed as described by Hajkova et al. (2002). The bisulfite reaction leads to the conversion of cytosines into uracil residues, which are recognized as thymines in the subsequent PCR amplification and sequencing, whereas the methylcytosines do not react and are therefore detected as cytosines. This method allows direct and positive determination of methylation sites in the genomic DNA. Briefly, genomic DNA was digested with EcoRV, boiled for 5 min and chilled on ice. Fresh NaOH was added to a final concentration of 0.3 M and incubated for 15 min at 50°C and then mixed with two volumes of melted 2% (w/v) low-melting agarose prepared in water (Sigma). A fresh bisulfite/hydroquinone solution (2.5 M/M; Sigma) overlaid with heavy mineral oil was kept on ice 30 min before to pipet aliquots of the DNA–agarose mixture into it. The preparation was kept on ice for 30 min and then incubated at 50°C for 4 h. DNA–agarose beads were then washed four times with Tris–EDTA, pH 8, two times with NaOH 0.2 M and then two times with water prior to PCR amplification using RedTaq Genomic PCR kit and designed primers for SOD and catalase amplification, respectively: 5'ATTTGATTTGAAGCCCCAC 3' and 5'GCAAACAAAAAGCAGGTCG3' or 5'TT CCCTGTGTTTTTCATTCG3' and 5'CTCCAACAGG CTTTTCACTC3'. The PCR products were subcloned using TOPOTA cloning kit recommendations and then sequenced as already mentioned. For each sample, 6–10 clones were sequenced. A single CpG site was considered to be methylated when more than half of the clones retained an unmodified cytosine at that position.

#### Analysis of histone deacetylation

Histones were isolated from frozen sugarbeet samples and purified according to Edmondson and Roth (1998)

using phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) in order to prevent protein degradation. Equal amounts of protein extracts and histone H3 enriched preparation from calf thymus (arginine-rich subgroup f<sub>3</sub>; Sigma) were subjected to SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad) or stained with Coomassie blue. Prestained SDS-PAGE standards (Precision Plus Protein All blue mixed with Precision Plus Protein Strep-Tactin-AP conjugate standards from Bio-Rad) were also loaded on gel. Blotted membranes were analyzed as immunoblots using polyclonal antibodies raised against human H3 histone, human acetylated H3 histone or acetylated lysine (Santa Cruz Biotechnology and Cell Signaling, USA) at 1:1,000 dilutions (v/v). Cross-reacting bands were identified using anti-goat immunoglobulin conjugates labeled with alkaline phosphatase (Sigma), with 1:2,000 dilution (v/v) and stained with BCIP/NBT liquid substrate system (Sigma) or chemiluminescent immunstar detection system (Bio-Rad). Blots and autoradiograms were scanned (Epson perfection 1640 SU model G754A) and the protein amounts were quantified using imaging software (ImageTool for Windows version 3.00). Similar amounts of histone extracts were loaded on SDS-PAGE for each blot and the histone acetylation ratio was calculated as the ratio between acetylated H3 histones and non-acetylated H3 histones.

Histone deacetylases (HDAC, EC 3.5.1.) extraction was done as described by Lechner et al. (2000). A maize-HD1A recombinant protein was used as the positive control. Immunoblots were performed with antibodies raised against different maize HDAC families: HD1A antibodies at 1:1,000 dilution (v/v); N-terminal part of HD1A (HD1A-Nt) at 1:2,000 dilution (v/v); HD1BI antibodies at 1:1,000 dilution (v/v) and HD2 antibodies at 1:3,000 dilution (v/v) (Pipal et al. 2003). An adapted method of Hoffmann et al. (1999) was used to measure the HDAC activity with MAL artificial substrate (Sigma).

#### Statistical analysis

Data management and statistical analyses were performed with SPSS statistical software package (SPSS version 11.0.1 PC, Chicago, IL, USA). Means were expressed with their standard error and compared by ANOVA (GLM procedure). All statistical tests were considered significant at  $P \leq 0.05$ . In order to characterize the variability of the cell redox state between treated cell lines, multivariate analyses using principal component analysis from 24 biochemical parameters of the cell redox state was performed. Principal component analysis is a descriptive method that presents the advantage to maximize in two dimensions the variability observed from more than three variables. The basic variables were standardized and orthogonal factors (= F1 and F2 axes) were successively built as linear combinations of these variables to maximize the part of the variability explained by these factors as we have already described in Monclus et al. (2005). The F3 axis did not differentiate the treated lines (data not shown). Variables were repre-

sented on the plane defined by the two main factors of the principal component analysis; their coordinates were their linear correlation coefficients (Pearson's coefficient,  $r$ ) with these factors.

## Results

### Relationship between cell redox and cell differentiation states

Compared to organogenic (O) and non-organogenic (NO) lines, dedifferentiated cells (DD) exhibited the highest ROS steady-state level, products of membrane lipid peroxidation (conjugated dienes, TBARs and lipid hydroperoxides) contents and the lowest amounts of chlorophylls, which are known as ROS-sensitive molecules (Fig. 1). In addition to oxidation by ROS, lipid hydroperoxides result from lipoxygenase activities that were shown to be lower in the DD and NO lines than in the O line. Altogether these data suggest increasing oxidative stress states between O, NO and DD lines, respectively, in our culture conditions.

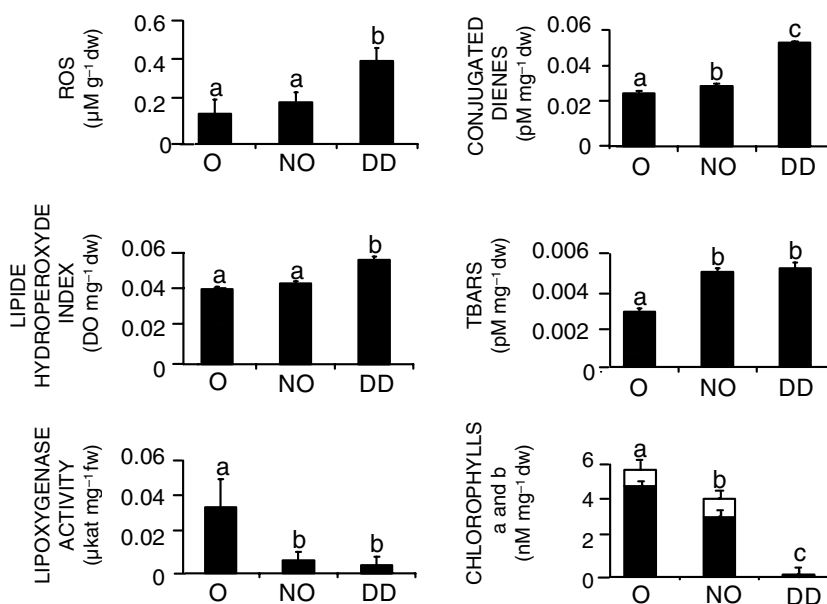
The DD line displayed the highest total NEAOP in keeping with its high contents of non-enzymatic protective molecules such as ascorbate, glutathione,  $\alpha$ -tocopherol, and soluble phenolic compounds (1.5–2 fold) (Fig. 2a). LC-MS analysis of soluble phenolic derivatives revealed similar peaks (i.e. phenolic compounds) in all lines, but in higher quantities in DD line (Fig. 2b). Higher reduced per oxidized ratios were measured for both ascorbate and glutathione in the DD line. It is generally believed that maintaining a high reduced per oxidized ratio of ascorbic acid and glutathione, as in DD cells, reflects an intensive ROS-scavenging activity

(Mittler 2002). Enzymatic protective systems in the sugarbeet lines can be classified into three groups (Fig. 3a): (1) activities that decrease (SOD and peroxidase) between O, NO and DD lines, respectively; (2) activities that increase (APX, CAT and MDAR); and (3) unchanged activities (DHAR and GR). As SOD is a major scavenging enzyme acting as the first line of defense with several isoforms at distinct subcellular localizations (Martinez et al. 2001), SOD inhibitors were used to allow the identification of FeSOD and Cu/ZnSOD, but not MnSOD isoforms, in the three lines (Fig. 3b). FeSOD activity was found in similar proportions in all lines, whereas Cu/ZnSOD activity decreased in the following order: O, NO and DD lines, respectively.

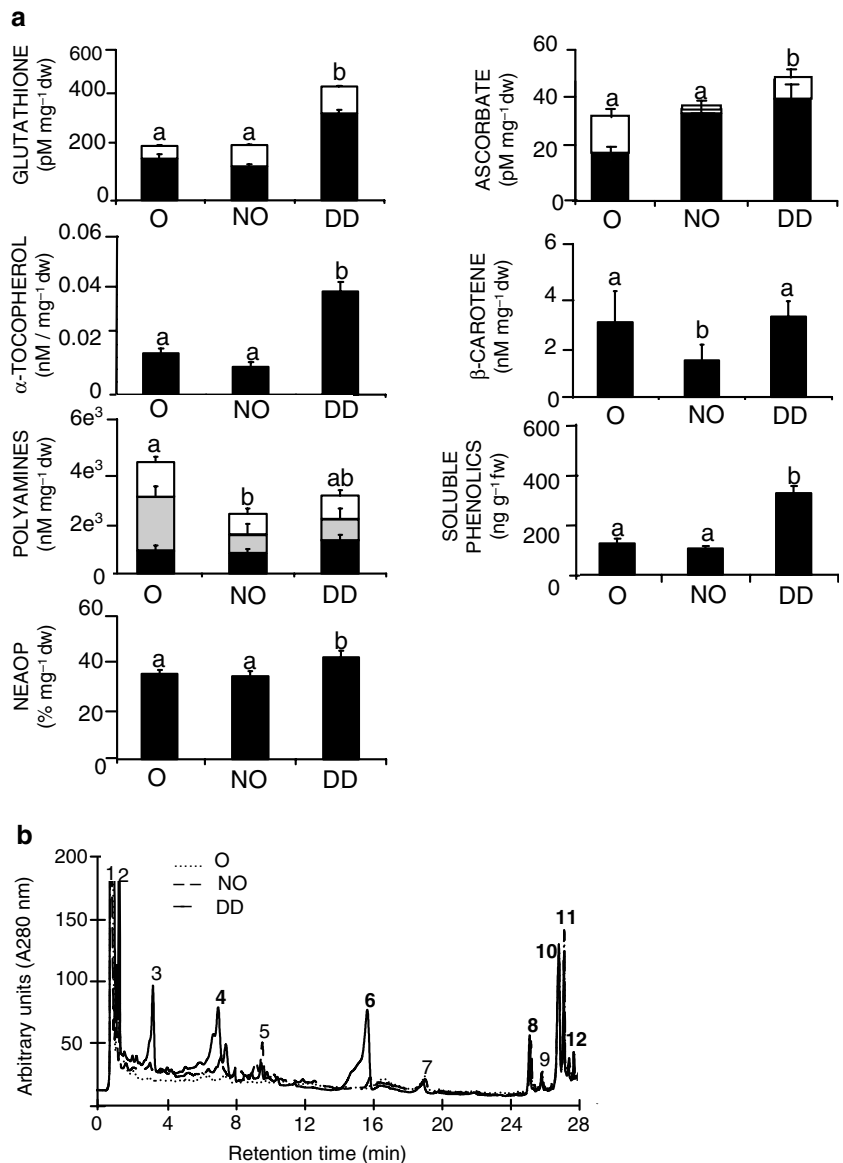
### Relationship between epigenetic parameters and cell differentiation states

A range of procedures, including the use of inhibitor of proteases, was tested to optimize the extractions of histones from sugarbeet. The histone acetylation ratio was then calculated as the ratio between acetylated H3 histones and non-acetylated H3 histones measured using polyclonal antibodies raised against acetylated or non-acetylated H3 histone, respectively (Fig. 4). Acetylation ratios were higher in the NO ( $0.43 \pm 0.02$ ) and O lines ( $0.41 \pm 0.01$ ) than in the DD line ( $0.37 \pm 0.01$ ) (Figs. 4, 5a). Using polyclonal antibodies raised against acetylated lysine, bands corresponding to acetylated H3 and acetylated H4 histones were detected (Fig. 4). The intensity of the bands corresponding to acetylated H3 histones was stronger than those of acetylated H4 histones. Nevertheless, the use of these data to calculate the histone acetylation ratios for the sugarbeet cell lines gave similar results to those previously obtained with acetylated H3 histones antibodies. Methylcytosine percentages ranged from

**Fig. 1** Determination of ROS steady-state level, membrane peroxidation products contents (conjugated dienes, lipid hydroperoxides and TBARs), lipoxygenase activity, chlorophyll a (black bars) and chlorophyll b (white bars) contents in sugarbeet cell lines. Data are means  $\pm$  SE from three independent replicates. Values marked with different letters are significantly different between cell lines ( $P \leq 0.05$ ) as determined by one-way ANOVA. *dw* dry weight, *fw* fresh weight



**Fig. 2** Determination of non-enzymatic antioxidant properties (NEAOP) and contents of various protective molecules in three sugarbeet cell lines. **a** Data are means  $\pm$  SE from three independent replicates. Values marked with *different letters* are significantly different between cell lines ( $P \leq 0.05$ ) as determined by one-way ANOVA. *dw* dry weight, *fw* fresh weight. For glutathione: *black bars* correspond to oxidized glutathione and *white bars* to reduced glutathione. For ascorbate: *black bars* correspond to ascorbate and *white bars* to dehydroascorbate. For polyamines: *black bars* correspond to free polyamines fraction, *grey bars* to soluble conjugated polyamines and *white* to insoluble bound-polyamines fraction. **b** HPLC chromatograms of soluble methanolic extracts of O (*dotted line*), NO (*dashed line*) and DD (*full line*) lines ( $\lambda = 280$  nm). MS analysis indicate that *peak 1* is  $m/z = 377$ , *peak 2* is  $m/z = 128$ , *peak 3* is  $m/z = 354$ , *peak 4* is  $m/z = 576$ , *peak 5* is  $m/z = 563$ , *peak 6* is  $m/z = 548$ , *peak 7* is  $m/z = 398$ , *peak 8* is  $m/z = 675$ , *peak 9* is  $m/z = 764$ , *peak 10* is  $m/z = 573$ , *peak 11* is  $m/z = 712$ , *peak 12* is  $m/z = 645$



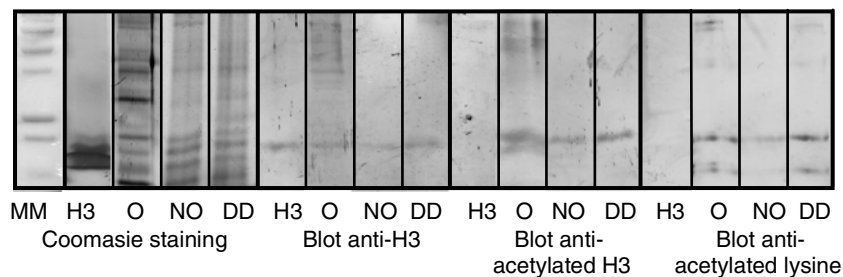
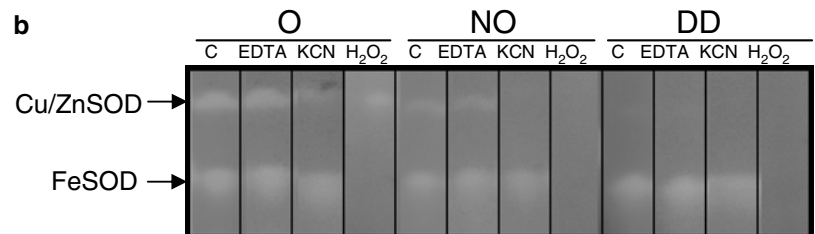
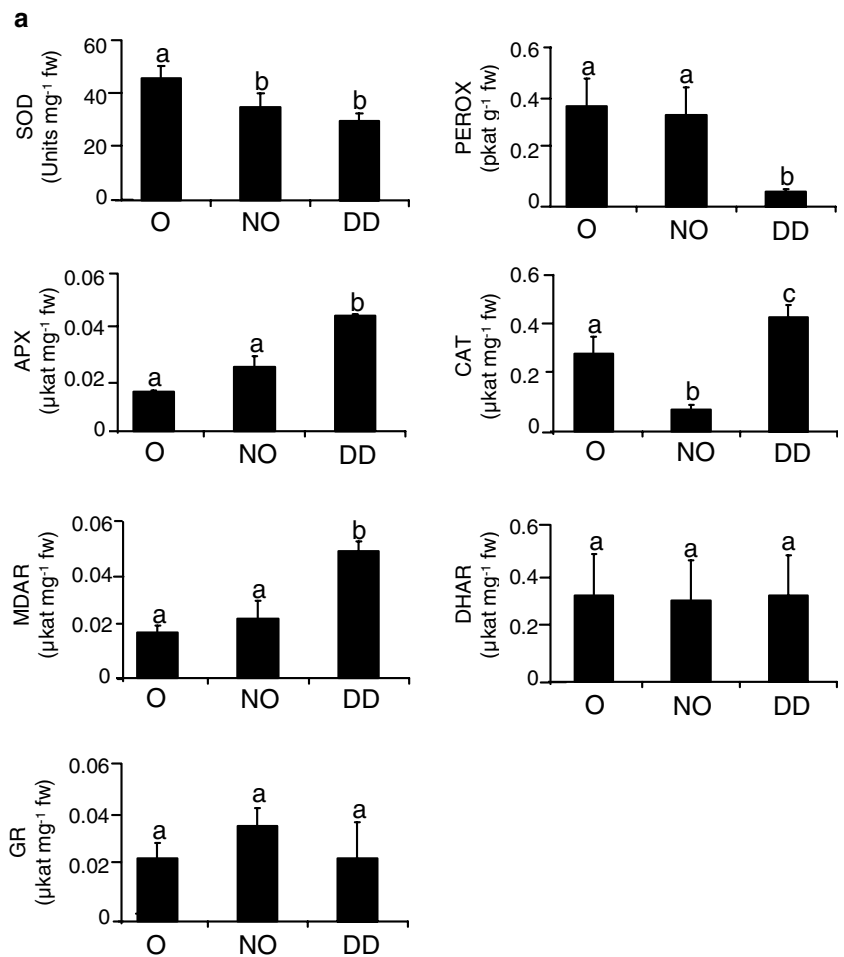
18.6 $\pm$ 0.7% (O line) to 32.0 $\pm$ 2.7% (DD line) in agreement with our earlier report (Causevic et al. 2005) (Fig. 5a).

The strongest DNA methyltransferase (DNMT) and histone deacetylase (HDAC) activities were found in the O line and particularly in the chromatin-bound fractions for the HDAC activity (Fig. 6a). Western blot analyses using antibodies raised against the three classes of maize HDAC revealed different proteins in the three sugarbeet extracts (Fig. 6b). The 100 and 90 kDa bands detected with antibodies raised against HD1A (whole protein) were in higher amounts in the O and NO lines than in the DD line. In addition to these two proteins, bands of lower sizes (from 80 to 28 kDa) were revealed using antibodies raised against the N-terminal part of HD1A. The number of these bands and their sizes were different between lines, the O line displaying the most complex profile. A similar situation was observed using HD1B antibodies that also detected the 100 and 90 kDa bands in higher amounts in the O and NO lines than in the DD

one. On the contrary, HD2 antibodies showed specific bands of 58 and 32 kDa in the O line; 55 kDa in the NO line; and 65 kDa in the DD one. Results concerning the use of DNMT antibodies on sugarbeet extracts have already been reported (Causevic et al. 2005).

Identification of differences in patterns of DNA methylation at CpG-rich loci between DNA extracted from the organogenic and non-organogenic sugarbeet callus lines was performed by RLGs (Fig. 7a). Spots could be classified into two groups: (1) spots that can be superposed in both RLGs profiles and (2) spots that are unique in one of the two RLGs profiles, suggesting remodeling of the methylation state of some CpG-rich loci. The DNA fragments (comprising 0.1–1 kb) have been cloned and sequenced; the results of homology studies by local alignments (BLASTn) and their Genbank accession numbers are compiled in Table 1. Five of these biomarkers of sugarbeet morphogenesis were homologous with plant proteins involved in cell cycle,

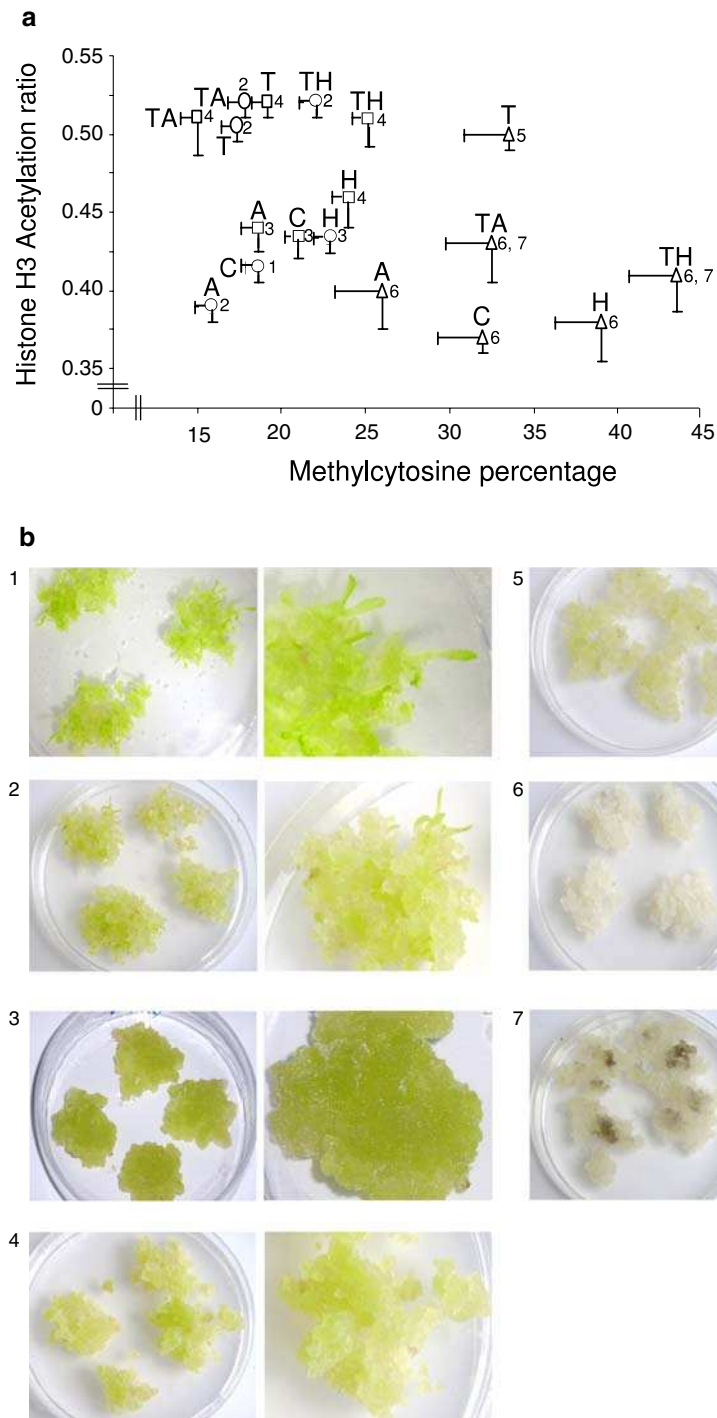
**Fig. 3** Protective enzymatic activities in three sugarbeet lines. **a** Data are means  $\pm$  SE from three independent replicates. Values marked with *different letters* are significantly different between cell lines ( $P \leq 0.05$ ) as determined by one-way ANOVA. *fw* fresh weight. **b** Representative native *in gel* activity of SOD isozymes in three sugarbeet callus lines. Identification of SOD isozymes was performed by pre-incubation of native gels with 10 mM EDTA, 100 mM KCN (inhibitor of FeSOD and MnSOD isoenzymes) or 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Cu/ZnSOD and MnSOD isoenzymes) or without treatment (C) prior to activity staining



**Fig. 4** Histone extracts from three sugarbeet cell lines (O, NO and DD) were separated by SDS-PAGE, stained with Coomassie or immunoblotted with H3 histone or acetylated H3 histone or acetylated lysine antibodies. H3 histone enriched preparation (H3) from calf

thymus was used as the control. Similar amounts of histone extracts were loaded for each lane. Prestained SDS-PAGE standards were also loaded on gel (MM)

**Fig. 5** Levels of epigenetic parameters and phenotypes in treated sugarbeet cell lines. **a** Methylcytosine percentages and H3 histone acetylation ratios (measured using polyclonal antibodies raised against acetylated or non-acetylated H3 histone) were determined in all treated lines, originated from Organogenic O line (*open circles*), non-organogenic NO line (*open squares*) and dedifferentiated DD line (*open triangles*) and treated with 5-azacytidine (*A*), hydroxyurea (*H*) and/or trichostatin A (*T*) or untreated (*C*). Data are means  $\pm$  SE of four independent replicates. *Numbers* (from 1 to 7) correspond to the phenotype of each cell culture. **b** Summary of the phenotypic changes (*numbered* from 1 to 7) observed in the treated or not sugarbeet cell lines. 1 organogenic line, 2 organogenic line with white dedifferentiated cells, 3 non-organogenic line, 4 non-organogenic line with white dedifferentiated cells, 5 dedifferentiated line with green differentiated cells, 6 dedifferentiated line, 7 dedifferentiated line with brown necrotic cells



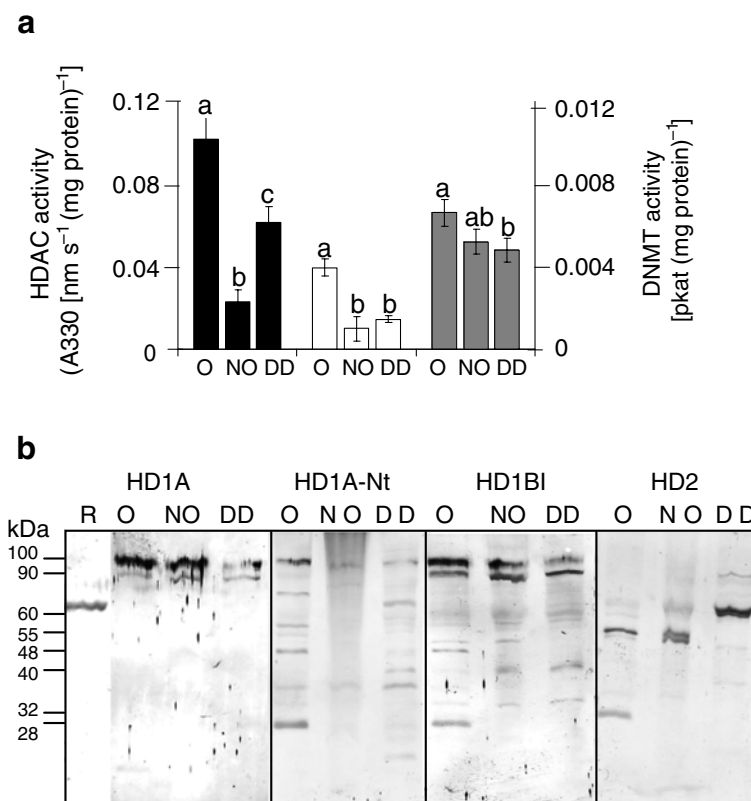
embryogenesis or gene expression regulation (as serine/threonine protein kinase, zinc finger protein regulator of chromosome condensation, crooked neck pre-mRNA splicing protein, MAPKK and late embryogenesis abundant DNA binding protein). One biomarker showed homology to protein involved in carbon and nitrogen metabolisms (aminotransferase) and another in vacuolar transport (ABC transporter type). The other two showed no homology to proteins of known function.

Relationship between epigenetic parameters, cell redox and cell differentiation states

Southern blot experiments, using DNA digested with methylation-sensitive enzymes (PvuII, TaqI or HpaII), revealed distinct bands in genomic DNA from the O, NO and DD lines, when hybridized with SOD, APX or catalase probes (Fig. 7b). These results were confirmed by PCR amplifications of bisulfite-treated genomic DNA,



**Fig. 6** Analysis of histone deacetylase (HDAC) and DNA methyltransferase (DNMT) in the cell lines. **a** Enzyme assays for HDAC were performed with sugarbeet chromatin-bound protein extracts (*black bars*) or soluble protein extracts (*white bars*). DNMT activities were measured with soluble protein extracts (*grey bars*). Data are means  $\pm$  SE from three independent replicates. *Different letters (a, b and c) denote significant differences between cell lines for each enzyme activity ( $P \leq 0.05$ ) as determined by one-way ANOVA.* **b** Western blots with antibodies raised against (from *left to right*): the maize HD1A (whole protein), the maize N-terminal part of HD1A, the maize HD1B, the maize HD2 proteins. Proteins separated by SDS-PAGE were prepared from the three sugarbeet callus lines (O, NO and DD) and from the maize-HD1A recombinant protein (R). Sizes of detected bands are indicated in kDa



where cytosines are converted into uracil residues whereas the methylcytosines do not react (Hajkova et al. 2002; Laird 2003). Specific primers from the 5' region of SOD or catalase genes were designed and showed distinct patterns of methylation in the three cell lines (Fig. 7c). Furthermore, the proportion of methylated CpG dinucleotides in the SOD region was higher in the DD line (7 out of 8 sites) than in the O (5/8) and NO (4/8) lines and was higher for NO (4/5) than O (2/5) and DD (2/5) for the catalase region.

Different treatments modifying DNA methylation ( $\pm 25\%$  of methylcytosine content) and/or histone acetylation levels ( $\pm 0.13$  of histone H3 acetylation ratio) were performed on the three lines (Fig. 5a). Distinct cell lines originating from O, NO and even DD lines were obtained by modification of one or both epigenetic parameters (Fig. 5a, b). Indeed, loss of shoot regeneration and presence of white dedifferentiated cells or brown necrotic cells were observed in cell lines (Fig. 5a, b, see pictures 1–4 and 7). Yellow/green cells appeared in histone hyperacetylated DD cell line, suggesting a redifferentiation process (Fig. 5a, b, pictures 5 and 6).

Principal component analysis was performed, using the data obtained on 14-days-treated cell lines, to characterize the variability of the cell redox state between treated cell lines (Fig. 8a; Supplementary data S1; see [Material and methods](#)). The main plane of principal components analysis (F1  $\times$  F2) explained 52.5% of the variability, with 34.7% for F1 alone. The coordinates of each variable in this main plane (F1  $\times$  F2) were defined

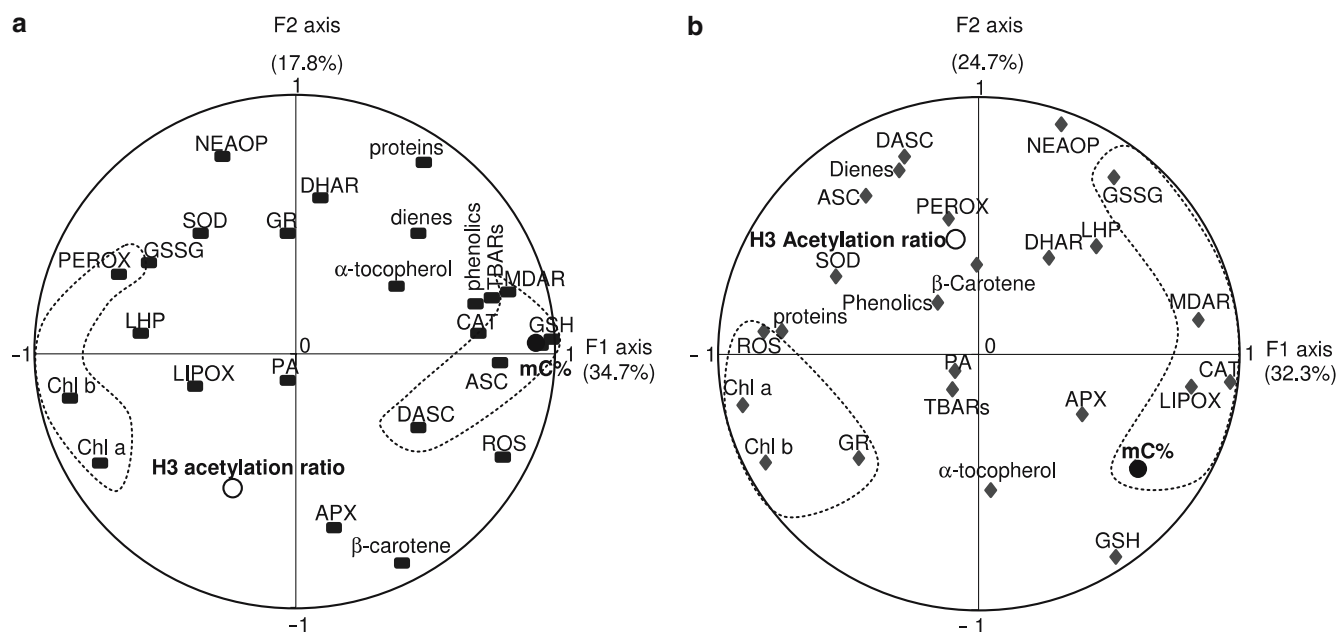
by their linear correlation coefficients (Pearson's coefficient,  $r$ ) with these axes. Linear correlation between the levels of methylcytosine or acetylated-histone and F1 or F2 axes were computed. The calculated Pearson's coefficients correspond to their coordinates in this main plane (Table 2). Methylcytosine percentage scaled positively with F1 axis (Pearson's coefficient  $r = 0.93$  at  $P \leq 0.01$ ), while histone acetylation ratio scaled negatively with F2 ( $r = -0.53$  at  $P \leq 0.05$ ). All these results were obtained on 14-days-treated cells. Similar analysis was then repeated on sugarbeet cell lines treated for 21 days (Fig. 8b; Supplementary data S2 and Table 2) and methylcytosine percentage scaled positively with F1 axis (Pearson's coefficient  $r = 0.60$  at  $P \leq 0.001$ ) and negatively with F2 ( $r = -0.45$  at  $P \leq 0.01$ ), while histone acetylation ratio scaled positively with F2 axis ( $r = 0.45$  at  $P \leq 0.01$ ).

Among the 36 cell redox state parameters, 23 measured on day 14 and 12 on day 21 were correlated to methylcytosine percentage (Table 2). Methylcytosine percentage was negatively correlated to the levels of seven parameters: lipid hydroperoxides, chlorophylls a and b, oxidized glutathione, lipoxygenase, SOD and peroxidase. Methylcytosine percentage was, in contrast, positively correlated to the levels of 16 parameters: ROS steady state, TBARs, reduced glutathione, ascorbate, dehydroascorbate, catalase, MDAR, total soluble phenolic compounds and 8 of the 12 soluble phenolic derivatives separated by HPLC (Table 2). These eight compounds accounted for 85% of the total soluble phenolic content. In addition, 4 cell redox parameters



**Table 1** Accession numbers, sizes and highest BLASTn results against plants databanks for sugarbeet genomic sequences identified and cloned by Restriction Landmark Genome Scanning (RLGS)

Genbank accession numbers of sugarbeet genomic sequences	Sizes (pb)	BLASTn identities; species; encoded proteins and function; TIGR or Genbank accession numbers
DQ073528	140	65%; <i>Arabidopsis</i> ; zinc finger protein putative regulators of chromosome condensation (RCC1 family) involved in mitosis; NM_121947
DQ323034	251	63%; <i>Arabidopsis</i> ; mitogen-activated protein kinase family involved in cell cycle; At1g18350.1
DQ073527	459	60%; rice; putative serine/threonine protein kinase involved in cell cycle; LOC_Os12g23700
DQ323033	450	59%; rice; late embryogenesis abundant (LEA) group 1 with possible DNA binding function; 11680.t00104 LOC_Os06g02040
DQ073530	495	58%; rice; putative crooked neck protein involved in embryogenesis, cell cycle progression and in pre-mRNA splicing; LOC_Os11g08350
DQ323035	195	72%; sugarbeet; ABC-type transporter involved in vacuolar transport of organic anions; TC3023
DQ073529	1,038	61%; wheat; putative protein aminotransferase with a role in C and N metabolism; TC243782
DQ073526	539	89%; <i>Arabidopsis</i> ; putative protein of unknown function; CO048724
DQ323032	712	63%; sugarbeet putative protein of unknown function; BQ593991



**Fig. 8** Principal component analysis representation allowing the characterization of the variability of the cell redox state between treated cell lines. **a** At day 14; **b** at day 21. Variables were represented on the plane defined by the two main factors of the principal component analysis; their coordinates were their linear correlation coefficients. Linear correlation coefficients between F1 or F2 axes and methylcytosine percentage (filled circles) or histone H3 acetylation ratio (open circles) were calculated in treated or not sugarbeet cultures and used as their coordinates. Variables that are correlated to F1 axis are surrounded by a gray line. APX ascorbate peroxidase,

ASC ascorbate, CAT catalase, Chl a and b chlorophylls a and b, DASC dehydroascorbate, DHAR dehydroascorbate reductase, Dienes conjugated dienes, GR glutathione reductase, GSH reduced glutathione, GSSG oxidized glutathione, LIPOX lipoxygenase, LHP lipid hydroperoxides, mC% percentage of methylcytosine, MDAR monodehydroascorbate reductase, NEAOP non-enzymatic antioxidant properties, PA polyamines, PEROX peroxidase, phenolics soluble phenolic compounds, ROS reactive oxygen species, SOD superoxide dismutase, TBARs thiobarbituric acid reactive substances

DD line (APX/CAT). Nevertheless, all these data should be taken cautiously due to redundancies and synergies between ROS-scavenging mechanisms, complex subcellular localizations and reciprocal modulations between mechanisms (Mittler 2002; Edreva 2005). ROS and cellular redox systems are also known to act as intracellular messengers during growth and differentiation in a number of organisms (Sauer et al. 2001; Boonstra and Post 2004; Mittler et al. 2004). These roles depend on cell type,

ROS type and amount and the duration of the exposure. However, it is still unclear whether the differential regulation of protective systems is merely a response to changes in oxidative stress during development or, alternatively, a component of the developmental program that modulates the utilization of ROS as regulators of cell differentiation. Nevertheless, many published results support the hypothesis that prolonged exposure to relatively low ROS doses, as seen in the O line, results in

**Table 2** Pearson's coefficients ( $r$ ) from linear correlations measured between levels of 36 parameters of the cell redox state and methylcytosine percentage (mC%) or H3 histone acetylation ratio (H3 acetylation ratio) in treated or not sugarbeet lines ( $n \geq 36$ )

Parameters	mC%		H3 acetylation	
	D14	D21	D14	D21
ROS steady-state level	0.75**	NS	NS	NS
Conjugated dienes	NS	-0.41***	NS	0.53***
TBARs (including malondialdehyde)	0.53*	NS	NS	NS
Lipid hydroperoxides	-0.57*	0.50***	NS	NS
Lipoxygenase	-0.67*	0.54***	NS	NS
Chlorophyll a	-0.73**	-0.33*	NS	0.41***
Chlorophyll b	-0.79**	NS	NS	NS
Superoxide dismutase	-0.70*	NS	NS	NS
Peroxidase	-0.69**	-0.38*	NS	NS
Ascorbate peroxidase	NS	NS	0.62*	NS
Catalase	0.72*	0.73***	NS	-0.37*
DHAR	NS	0.57***	-0.58*	0.39*
MDAR	0.77**	0.62***	NS	-0.38*
Glutathione reductase	NS	NS	NS	NS
Total protein	NS	NS	NS	NS
NEAOP	NS	NS	NS	NS
GSH	0.93**	0.39*	NS	-0.38*
GSSG	-0.58*	NS	0.45*	NS
Ascorbate	0.78**	0.44*	NS	NS
Dehydroascorbate	0.70**	-0.30*	NS	NS
$\alpha$ -Tocopherol	NS	NS	NS	-0.48***
$\beta$ -Carotene	NS	NS	0.50*	NS
Polyamines	NS	NS	NS	NS
Total soluble phenolics	0.81**	0.20*	NS	NS
Phenolic compound 1 (MS 377)	0.88**	NS	NS	NS
Phenolic compound 2 (MS 128)	0.88**	NS	NS	NS
Phenolic compound 3 (MS 355)	NS	NS	NS	NS
Phenolic compound 4 (MS 576)	0.74**	NS	NS	NS
Phenolic compound 5 (MS 563)	NS	NS	NS	NS
Phenolic compound 6 (MS 548)	0.76**	NS	NS	NS
Phenolic compound 7 (MS 399)	NS	NS	NS	NS
Phenolic compound 8 (MS 675)	0.73**	NS	NS	NS
Phenolic compound 9 (MS 761)	NS	NS	NS	NS
Phenolic compound 10 (MS 573)	0.45*	NS	NS	NS
Phenolic compound 11 (MS 712)	0.48*	NS	NS	NS
Phenolic compound 12 (MS 645)	0.51*	NS	NS	NS
F1 axis of principal component analysis	0.93**	0.60***	NS	NS
F2 axis of principal component analysis	NS	-0.45**	-0.53*	0.45**

F1 and F2 axes referred to the principal component analysis presented in Fig. 7

NS non-significant, ROS reactive oxygen species, TBARs thiobarbituric acid reactive substances, DHAR dehydroascorbate reductase, MDAR monodehydroascorbate reductase, NEAOP non-enzymatic antioxidant properties, GSH reduced glutathione, GSSG oxidized glutathione

Levels of significance are \* $P \leq 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$

an activation of signal transduction pathways similar to the effects of cell differentiation factors (for a review see Boonstra and Post 2004). In contrast, prolonged exposure to high ROS doses, as in the DD line, will induce cell damage and/or proliferation. Results dealing with cell redox state have been reported more than 10 years ago for the sugarbeet DD and NO lines only (Hagège et al. 1992; Cerrie et al. 1994; Cherif et al. 1996; Hagège 1996). Minor discrepancies between these previous results and the present work are probably due to variations of the in vitro cultures during the intervening years (Hasler et al. 2003), as well as to the methods used (spectrophotometric analysis vs. HPLC determination). However, our first aim was to monitor the basic cell redox state of these lines.

#### Epigenetic parameters and cell differentiation state

As H3 histone was found to be the most extensively acetylated in plants (Lusser et al. 2001), the histone acetylation ratio was calculated as the ratio between acetylated and non-acetylated H3 histones. Antibodies raised against human acetylated or non-acetylated H3 histones have already been used in plants for histone acetylation determination due to the high histone conservation in eukaryotes (Law and Suttle 2005). Using polyclonal antibodies raised against acetylated lysine, we showed that H3 histones were more acetylated than H4 in sugarbeet lines, and that histone acetylation ratios measured using acetylated H3 histone antibodies or acetylated lysine antibodies were similar. Such a ratio might reflect, in

part, the quantitative variations of H3 histone acetylation in a given plant. Here, we found that this ratio, as the methylcytosine percentage, is related to the morphogenic capacity of the cell line. Distinct DNMT and HDAC activities and corresponding isoforms were also assessed in the three cell lines. In maize, four biochemically distinct HDAC activities have been identified: HD1A (48 kDa), HD1BI and II (51 and 58 kDa) and HD2 (39, 42 and 45 kDa). This classification is based on chromatographic behavior, subcellular localization and enzymatic properties of the respective protein complexes (Lusser et al. 2001; Loidl 2004). Using antibodies raised against the maize HD1A, HD1B or HD2 proteins, bands with different sizes and intensities were detected in the sugarbeet lines. Recently, the maize histone deacetylase HD1A active monomer with a molecular weight of 48 kDa was shown to be obtained from the processing of 84 and 65 kDa precursors. This limited proteolysis of the C-terminal part of HD1A allowed a regulation of HDAC activity during embryo germination in vivo (Pipal et al. 2003). A similar regulation may exist in sugarbeet lines during in vitro morphogenesis, since distinct bands could be detected in the three lines using one class of antibody. Indeed, the additional bands of lower sizes detected with antibodies raised against the N-terminal part of HD1A could be obtained by a limited proteolysis of the C-terminal part of the 100 and 90 kDa isoforms. Furthermore, as HD1A and HD1B shared 44% of similarities in their N-terminal parts, this could also explain the cross-reactions observed between HD1A (whole or N-terminal part) and HD1B antibodies. The distinct bands detected in the sugarbeet lines using antibodies against HD2 that do not share similarity with the other HDACs could also originate from differential limited proteolysis. Finally, it is not possible to exclude that unspecific cross-reactions occurred since heterologous antibodies were used. Concomitant analysis in plant cell cultures at distinct states of differentiation of histone acetylation, DNA methylation and associated enzymes has not been previously reported, to our knowledge. Our data demonstrate that distinct morphogenic capacities of the lines are associated with different levels of epigenetic parameters and corresponding enzymes (DNMT and HDAC), in agreement with our previous report (Causevic et al. 2005).

#### Biomarkers of morphogenesis are epigenetically regulated

The use of DNA methylation markers and associated discovery techniques is well established in the detection of human cancers (for a review see Laird 2003), but these methods are still poorly exploited in plant studies. Three complementary molecular approaches were used in order to define biomarkers associated with morphogenesis that displayed distinct methylation states between the sugarbeet cell lines. First, RLGS method provides a quantitative epigenetic assessment of several gene-associated CpG islands in a single gel without prior knowledge

of gene sequence (Costello et al. 2002). Several publications demonstrate the successful use of RLGS to identify modifications of DNA methylation, particularly in tumorous cells (for a review see Rush and Plass 2002). In plants, RLGS has already been used to screen the global methylation state in the *Arabidopsis* genome (Matsuyama et al. 2003) and to analyze DNA deletions in an albino mutant genome (Abe et al. 2002). Here, we report the first use of RLGS as a means of screening for modifications in DNA methylation in the genome of sugarbeet cell lines displaying distinct differentiation states. Among the nine potential DNA markers of morphogenesis that we have cloned and sequenced, five are homologous to genes believed to be involved in cell cycle and embryogenesis and two in metabolic functions. All these results are in good agreement with the potential of these sequences as biomarkers of morphogenesis in sugarbeet cell lines. More work will be needed to understand the role in morphogenesis of the two last markers, whose functions are as yet unknown. Two gene candidate approaches were also applied to give direct molecular evidence for a relationship between DNA methylation pattern and the expression of some antioxidant enzymes. Southern blots revealed different patterns of methylation for sequences coding antioxidant enzymes as SOD, APX and catalase, in agreement with earlier results for peroxidase and phenylalanine ammonia lyase sequences (Causevic et al. 2005). Bisulfite sequencing confirmed the distinct methylation profiles of these genes. Furthermore, the proportion of methylated CpG sites scaled negatively with the levels of SOD and catalase activities measured in the three sugarbeet cell lines. Taken together, these results demonstrated a direct connection between epigenetic regulation and the expression of biomarkers during morphogenesis.

#### Relationship between epigenetic parameters, cell redox and cell differentiation states

Epigenetic parameters such as DNA methylation or histone deacetylation have already been shown to influence the phenotype in both animals and plants (Lambé et al. 1997; Rosato and Grant 2003; Tsuji-Takayama et al. 2004; Causevic et al. 2005). Here, seven distinct phenotypes characterized by the gain or loss of morphogenetic properties were obtained from three sugarbeet cell lines. Specifically, a redifferentiation process was observed, for the first time in a plant system, in TSA-treated DD cells as reported for TSA-treated tumor cells in an animal system (Rosato and Grant 2003). Analysis of 36 cell redox state markers in this collection of treated lines gave both statistical and biochemical evidence, for the first time to our knowledge, for a dynamic connection between plant morphogenesis in vitro, cell redox state and levels of epigenetic parameters. Such a connection has already been suggested in in vitro long-term plant cultures for somaclonal variations, stress and aberrant phenotypes or apoptosis, but was never shown after a short duration of treatment on cell lines (Kaepler et al. 2000; Joyce et al.

2003; Vanyushin et al. 2004). Further analysis of our RLGS molecular markers, such as the study of their expression profile using real-time PCR, will help to understand the mechanisms involved in plant developmental plasticity. The control of plant development *in vitro* is of both fundamental and applied interest for sugarbeet, which is cultivated on two million hectares, worldwide.

**Acknowledgements** The work and a Ph.D. grant (A. Causevic) were supported by the Ministère des Affaires Étrangères (Programme COCOP: Réseau d'Enseignement Régional Postgraduate en Biologie, grant no. DSUR-NGE-4B1-505). We are grateful to Prof. P. Loidl, Innsbruck Medical University, for providing HDAC antibodies and for his collaboration and to Dr. M. McGrath, Michigan University, for the SOD cDNA probe. We thank Prof. D. Locker (CNRS-Orléans), Prof. M. Maksimovic (University of Sarajevo), Prof. K. Bajrovic (INGEB, Sarajevo) and Prof. F. Delmotte (University of Orléans) for continuous interest in this work. We also thank Dr. S. Ounnar and Prof. M. Righezza (University of Orléans) for their help in mass spectrometry analysis and C. Jourdain, G. Moreau and E. Magnoux for their technical help. Dr. S. Barnes (SES-Europe, Tienen) and Prof. E. Lainé (University of Orléans) are gratefully acknowledged for their careful reading of the manuscript.

---

## References

- Abe T, Matsuyama T, Sekido S, Yamaguchi I, Yoshida S, Kameya T (2002) Chlorophyll-deficient mutants of rice demonstrated the deletion of a DNA fragment by heavy-ion irradiation. *J Radiat Res* 43:157–161
- Arabidopsis genome initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796–815
- Boonstra J, Post J (2004) Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Genes Cells* 337:1–13
- Causevic A, Delaunay A, Ounnar S, Righezza M, Delmotte F, Brignolas F, Hagege D, Maury S (2005) DNA methylating and demethylating treatments modify phenotype and cell wall differentiation state in sugarbeet cell lines. *Plant Physiol Biochem* 43:681–691
- Carrie B, Gaspar T, Greppin H, Penel C (1994) Redox characteristic of normal and habituated cell lines of sugarbeet. *Plant Cell Environ* 17:457–461
- Cherif M, Nodet D, Hagege D (1996) Malondiadehyde cannot be related to lipoperoxidation in habituated sugarbeet plant cells. *Phytochemistry* 41:1523–1526
- Costello J, Smiraglia D, Plass C (2002) Restriction landmark genome scanning. *Methods* 27:144–149
- Davey M, Dekempeneer E, Keulemans J (2003) Rocket-powered high-performance liquid chromatographic analysis of plant ascorbate and glutathione. *Ann Biochem* 316:74–81
- Dobosy J, Selker E (2001) Emerging connections between DNA methylation and histone acetylation. *Cell Mol Life Sci* 58:721–727
- Edmondson D, Roth S (1998) Interactions of transcriptional regulators with histones. *Methods: Companion to Methods in Enzymol* 15:355–364
- Edeeva A (2005) Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agric Ecosyst Environ* 106:119–133
- Finnegan E, Kovac K (2000) Plant DNA methyltransferases. *Plant Mol Biol* 43:189–201
- Franck T, Kevers C, Penel C, Greppin H, Hausman J, Gaspar T (1998) Reducing properties and markers of lipid peroxidation in normal and hyperhydrating shoots of *Prunus avium* L. *J Plant Physiol* 153:339–346
- Graessle S, Loidl P, Brosch G (2001) Histone acetylation: plants and fungi as model for the investigation of histone deacetylases. *Cell Mol Life Sci* 58:704–720
- Hagege D (1996) Habituation in sugarbeet plant cells: permanent stress or antioxidant adaptive strategy? *In Vitro Cell Dev Biol* 32:1–5
- Hagege D, Kevers CA, Gaspar T (1991) Abnormal growth of habituated sugarbeet callus and cell suspension. *In Vitro Cell Dev Biol* 27:112–116
- Hagege D, Kevers C, Salabert P, Gaspar T (1992) Protective systems against activated oxygen species compared in normal and fully habituated nonorganogenic sugarbeet calluses. *In Vitro Cell Dev Biol* 28:143–147
- Hajkova P, El-Maari O, Engemann S, Oswald J, Olek A, Walter J (2002) DNA-methylation analysis by the bisulfite-assisted genomic sequencing method. *Methods Mol Biol* 200:143–154
- Hasler J, Wuest J, Gaspar T, Crevecoeur M (2003) Long term *in vitro*-cultured plant cells show typical neoplastic features at the cytological level. *Biol Cell* 95:357–364
- Hodges D, Forney C (2000) The effects of ethylene, depressed oxygen and elevated carbon dioxide on antioxidant profiles of senescing spinach leaves. *J Exp Bot* 51:645–655
- Hoffmann K, Brosch G, Loidl P, Jung M (1999) A non-isotopic assay for histone deacetylase activity. *Nucleic Acids Res* 27:2057–2058
- Joyce S, Cassells A, Jain S (2003) Stress and aberrant phenotypes in *in vitro* culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 74:103–121
- Kaeppeler S, Kaeppeler H, Rhee Y (2000) Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Mol Biol* 43:179–188
- Laird PW (2003) The power and the promise of DNA methylation markers. *Nature* 3:253–266
- Lambé P, Mutambel H, Fouche J, Deltour R, Foidart J, Gaspar T (1997) DNA methylation as a key process in regulation of organogenic totipotency and plant neoplastic progression?. *In Vitro Cell Dev Biol* 33:155–162
- Law RD, Suttle JC (2005) Chromatin remodeling in plant cell culture: patterns of DNA methylation and histone H3 and H4 acetylation vary during growth of asynchronous potato cell suspensions. *Plant Physiol Biochem* 43:527–534
- Lechner T, Lusser A, Pipal A, Brosch G, Loidl A, Goralik-Schramel M, Sendra R, Wegener S, Walton J, Loidl P (2000) RPD3-type histone deacetylases in maize embryos. *Biochem* 39:1683–1692
- Leipner J, Stamp P, Fracheboud Y (2000) Artificially increased ascorbate content affects zeaxanthin formation but not thermal energy dissipation or degradation of antioxidants during cold-induced photo-oxidative stress in maize leaves. *Planta* 210:964–969
- Loidl P (2004) A plant dialect of the histone language. *Trends Plant Sci* 9:84–90
- Lusser A, Kölle D, Loidl P (2001) Histone acetylation: lessons from the plant kingdom. *Trends Plant Sci* 6:59–65
- Martinez CA, Loureiro ME, Oliva MA, Maestri M (2001) Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtilobum* and freezing sensitive *Solanum tuberosum* subjected to oxidative and water stress. *Plant Sci* 160:505–515
- Matsuyama T, Kimura M, Koike K, Abe T, Nakano T, Asami T, Ebisuzaki T, Held W, Yoshida S, Nagase H (2003) Global methylation screening in the *Arabidopsis thaliana* and *Mus musculus* genome: applications of virtual image restriction landmark genomic scanning (Vi-RLGS). *Nucleic Acids Res* 31:4490–4496
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7:405–410
- Mittler R, Vaunderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9:490–498
- Monclus R, Dreyer E, Delmotte F, Villar M, Delay D, Boudourisque E, Petit JM, Marron N, Bréchet C, Brignolas F (2005) Productivity, leaf traits and carbon isotope discrimination in 29 *Populus deltoids* × *P. nigra* clones. *New Phytol* 167:53–62
- Nakao M (2001) Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene* 278:25–31

- Pigliucci M (2001) Phenotypic plasticity: beyond nature and nurture. Baltimore University Press, Baltimore
- Pipal A, Goralik-Schramel M, Lusser A, Lanzanova C, Sarg B, Loidl A, Lindner H, Rossi V, Loidl P (2003) Regulation and processing of maize histone deacetylase Hda1 by limited proteolysis. *Plant Cell* 15:1904–1917
- Rosato R, Grant S (2003) Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 2:30–37
- Rush L, Plass C (2002) Restriction landmark genomic scanning for DNA methylation in cancer: past, present and future applications. *Anal Biochem* 307:191–201
- Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J (2001) Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem* 11:173–186
- Tsuji-Takayama K, Inoue T, Ijiri Y, Otani T, Motoda R, Nakamura S, Orita K (2004) Demethylating agent, 5-azacytidine, reverses differentiation of embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 323:86–90
- Vanyushin B, Bakeeva L, Zamyatnina V, Aleksandrushkina N (2004) Apoptosis in plants: specific features of plant apoptotic cells and effect of various factors and agents. *Int Rev Cytol* 233:135–179

**Bilan :** Les trois lignées cellulaires de betterave sucrière ont subi des traitements hypo- ou hyper-méthylants de l'ADN et/ou hyper-acétylant des histones entraînant des variations phénotypiques. Pour caractériser ces variations phénotypiques, 36 paramètres biochimiques et moléculaires du stress oxydatif ont été étudiés dans les lignées traitées ou non. Une corrélation statistique entre certains paramètres épigénétiques comme la méthylation de l'ADN, le niveau des paramètres redox et l'état de morphogenèse des lignées cellulaires a été démontrée. Une recherche des loci cibles des remaniements de la méthylation de l'ADN lors de l'organogenèse a alors été initiée par la méthode de RLGS (Causevic *et al.*, 2006). La comparaison des profils RLGS de l'ADN génomique des lignées O et NO a permis de trouver des séquences dont le profil de méthylation diffère entre ces lignées cellulaires. Ainsi, 9 séquences ont pu être identifiées. Certaines présentent une homologie de séquences avec des protéines impliquées dans le métabolisme ou la signalisation cellulaire. Elles s'ajoutent aux 6 séquences validées par une approche gène candidat (Causevic *et al.*, 2005 et **publication n°2**). Pour deux marqueurs candidats (la SOD et la catalase), les profils détaillés de méthylation par la méthode de séquençage au bisulfite confirment un polymorphisme épigénétique entre les lignées cellulaires. Ainsi, toutes les séquences isolées présentent un potentiel comme biomarqueurs épigénétiques de la morphogenèse *in vitro* de la betterave sucrière qu'il faudra confirmer ultérieurement.





## 5. Compléments sur la validation des biomarqueurs épigénétiques dans le cadre de la sélection assistée par marqueurs

Deux objectifs ont été fixés suite à la publication de nos travaux :

1. Achever la caractérisation d'autres marqueurs isolés par RLGS qui n'avaient pu être terminée pour la publication. Ceci dans le but d'enrichir notre collection de biomarqueurs épigénétiques potentiels.

2. Cribler ces marqueurs en réalisant leur profil de méthylation par le séquençage au bisulfite sur les lignées organogène et non organogène.

## 5.1. Caractérisation de marqueurs épigénétiques supplémentaires par RLGS

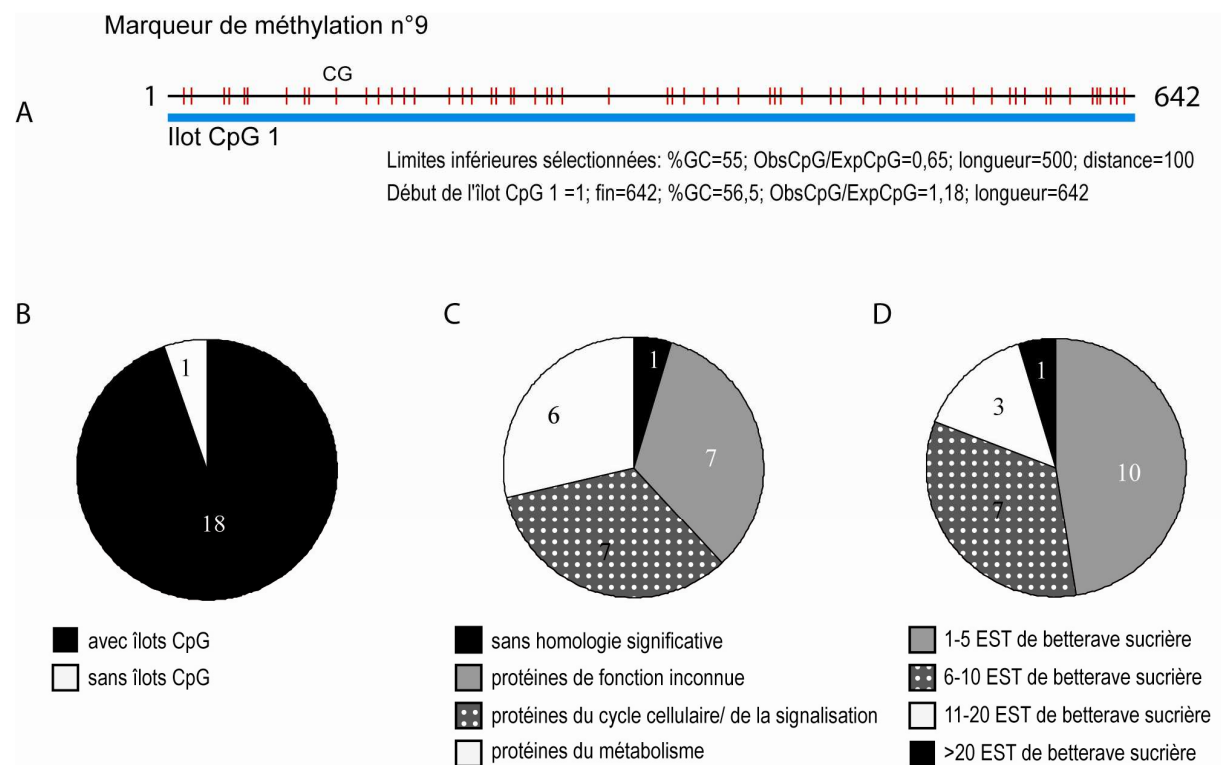
Au final, 21 séquences différentes (comprenant celles déjà publiées, **publication n°2**) ont été identifiées (Tableau 5). Parmi elles, sept correspondent à des spots superposables entre les profils RLGS des lignées O et NO et présentent bien la même séquence nucléotidique, confirmant ainsi la haute reproductibilité de la méthode de RLGS. De plus, parmi ces sept marqueurs, trois sont également retrouvés à deux endroits différents du même gel. Enfin, 14 séquences ne sont trouvées qu'une seule fois. Ces résultats correspondent bien à ce qui a été précédemment publié concernant l'utilisation de la méthode RLGS sur les plantes (Abe *et al.*, 2002 ; Matsuyama *et al.*, 2003 ; Causevic *et al.*, 2006 ; Takamiya *et al.*, 2006).

Les fragments isolés présentent des tailles comprises entre 134 et 1032 pb (Tableau 5). Les îlots CpG sont définis comme des séquences possédant plus de 50% de C+G, présentant un ratio de CpG observés sur attendus de plus de 0,60 et d'une taille minimum de 200 pb (Figure 32A) (Takai et Jones, 2002). Excepté deux marqueurs présentant une taille inférieure à 200 pb et ne pouvant par conséquent être analysés, la majorité (18 sur 19) des séquences isolées par RLGS est associée à des îlots CpG (Figure 32B). Chez les animaux, sur l'ensemble des gènes, 60% des promoteurs et des premiers exons seraient associés à ces îlots (Antequera, 2003). Plusieurs études révèlent que l'initiation de la réplication de l'ADN démarrerait au niveau de ces îlots CpG (Jeddeloh *et al.*, 1998 ; Wolffe et Matzke, 1999 ; Meyer, 2000 ; Vaucheret et Fagard, 2001 ; Richards et Elgin, 2002). Chez *Arabidopsis*, plusieurs études révèlent que les îlots CpG ne sont pas forcément localisés au niveau des régions promotrices. Ces "GC-skews" ( $=\frac{C-G}{C+G}$ ), où C et G correspondent au nombre de cytosines et de guanines, sont localisés près des sites d'initiation de transcription des gènes (Ioshikhes et Zhang, 2000 ; Ohler *et al.*, 2001 ; Davuluri *et al.*, 2001 ; Down et Hubbard, 2002 ; Ponger et Mouchiroud, 2002). D'autres études réalisées sur le riz montrent que la localisation des îlots CpG par rapport au gène est différente selon les espèces (Ashikawa, 2001).

**Tableau 5.** Numéro d'accèsion Genbank, taille, espèce végétale, meilleure homologie identifiée par BLASTn et profil sur les autoradiogrammes obtenus pour des séquences isolées à partir de lignées O et NO de betterave sucrière par RLGS.

Numérotation des marqueurs de méthylation	Numéro d'accèsion Genbank	Taille (pb)	Profil RLGS	Espèce et meilleure homologie correspondante identifiée par BLASTn
1	DQ073528	134	Deux spots superposés entre O et NO	<i>Arabidopsis</i> ; 65%, protéine putative en doigt de zinc, régulatrice de l'état de condensation des chromosomes
2	DQ323034	251	Spot NO unique	<i>Arabidopsis</i> ; 63%, protéine kinase impliquée dans le cycle cellulaire
3	DQ073527	448	Un spot superposé entre O et NO et un spot NO unique	Riz ; 60%, serine/thréonine kinase putative impliquée dans le cycle cellulaire
4	DQ323033	450	Spot O unique	Riz ; 59%, protéine impliquée dans l'embryogenèse
5	DQ073530	489	Spot O unique	Riz ; 58%, protéine putative de type 'crock-neck' impliquée dans l'embryogenèse
6	DQ323035	195	Spot O unique	Betterave sucrière ; 72%, protéine transporteur d'ions
7	DQ073529	1032	Un spot O unique et un spot NO unique	Blé ; 61%, aminotransférase
8	DQ073526	533	Un spot superposé entre O et NO et un spot NO unique	<i>Arabidopsis</i> ; 89%, protéine putative de fonction inconnue
9	DQ323032	638	Spot O unique	Betterave sucrière ; 63%, protéine putative de fonction inconnue
10	EU439035	309	Spot O unique	Aucune homologie significative
11	EU439036	275	Spot NO unique	<i>Arabidopsis</i> ; 57%, protéine putative en doigt de zinc, régulatrice de l'état de condensation des chromosomes
12	EU439037	363	Spot O unique	Tomate ; 61%, répétition de la triple hélice du collagène
13	EU439038	306	Un spot superposé entre O et NO	Pomme de terre ; 58%, protéine putative de fonction inconnue
14	EU439039	521	Spot NO unique	Tomate ; 63%, protéine putative de fonction inconnue
15	EU439040	365	Un spot superposé entre O et NO et un spot NO unique	Riz ; 60%, protéine kinase
16	EU439041	202	Spot O unique	Pomme de terre ; 73%, facteur d'initiation de la transcription
17	EU439043	530	Spot O unique	<i>Arabidopsis</i> ; 58%, protéine putative de fonction inconnue
18	EU439045	426	Un spot superposé entre O et NO	Blé ; 59%, 2-oxoglutarate oxygène dépendante
19	EU439046	302	Spot NO unique	<i>Arabidopsis</i> ; 95%, protéine putative de fonction inconnue
20	EU439042	222	Spot O unique	Riz ; 65%, protéine putative de fonction inconnue
21	EU439044	281	Spot O unique	Tomate ; 86%, protéine riche en glycine

Les résultats de la recherche d'homologie correspondent aux meilleurs résultats obtenus par "BLASTn" (Tableau 5, Figure 32C). Une seule séquence ne présente aucune homologie significative. Pour les autres marqueurs, environ un tiers (7) présente une homologie avec une protéine de fonction inconnue, un tiers (7) avec des protéines impliquées dans le cycle cellulaire ou la signalisation cellulaire, tels que des facteurs d'initiation de la transcription, des protéines intervenant dans l'état de condensation des chromosomes et des protéines sérine/thréonine kinases. Le dernier tiers (6) montre des homologies avec des protéines du métabolisme, telles que des aminotransférases, des oxoglutarates oxygène dépendantes, des protéines transporteuses d'ions et des protéines riches en glycine. Ces résultats complètent ceux précédemment décrits dans la publication Causevic/Gentil *et al.*, 2006.

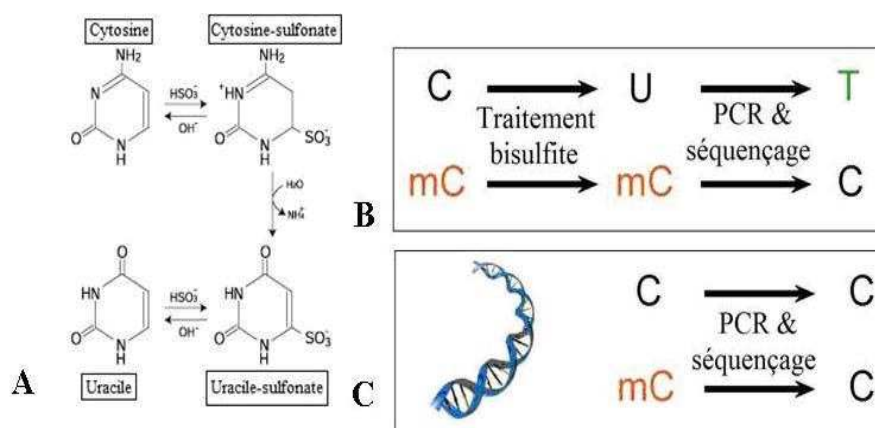


**Figure 32.** Analyse des îlots CpG et des homologies associées aux marqueurs de méthylation isolés par RLGS. (A) Exemple d'un îlot CpG associé au marqueur de méthylation 9 et ses caractéristiques. Les dinucléotides CG sont indiqués par une barre verticale rouge et les îlots CpG par une ligne horizontale bleue. Les diagrammes en camembert représentent les proportions de : (B) marqueurs de méthylation associés ou non à des îlots CpG ; (C) marqueurs de méthylation montrant une homologie avec différents types de protéines ou ne présentant aucune homologie significative après une analyse BLASTn ; (D) marqueurs de méthylation présentant une homologie avec un nombre distinct d'ESTs de betterave sucrière.

Afin d'évaluer une possible expression de ces marqueurs, une recherche d'homologie avec des ESTs de betterave sucrière a été réalisée (Figure 32D). L'ensemble des marqueurs présente des homologies avec des ESTs recensés dans des banques issues de graines en germination, de racines, de feuilles, d'inflorescences ou de plantes entières. Presque la moitié des marqueurs montre une homologie avec 1 à 5 ESTs et un tiers avec 6 à 10 ESTs.

Par conséquent, nos résultats montrent que les marqueurs RLGS isolés à partir de lignées cellulaires de betterave sucrière sont généralement associés à des gènes, présentant soit une fonction connue, soit une fonction inconnue et associés à un îlot CpG, en accord avec de précédentes études réalisées sur plantes (Rush et Plass, 2002 ; Causevic *et al.*, 2006).

Cependant, parmi les séquences isolées, toutes ne sont pas forcément corrélées à l'état d'organogénèse. Un criblage sera nécessaire afin d'identifier de possibles biomarqueurs épigénétiques de l'organogénèse.



**Figure 33.** Principe de la détermination de l'état de méthylation par la méthode du séquençage au bisulfite (d'après Gentil et Maury, 2007) : A, Réactions de conversion de cytosine en uracile par le bisulfite de sodium ; B, pour un ADN traité au bisulfite ; C, pour un ADN non traité au bisulfite.

**Tableau 6.** Récapitulatif des kits, protocoles et logiciels testés lors de la mise au point de la stratégie de validation de marqueurs épigénétiques.

Étapes	Nombre d'essais testés	Kits, protocoles et logiciels
<b>1. Traitement au bisulfite</b>  <b>et</b> <b>Vérifications</b>	3 kits	- EZ DNA methylation-Gold (Zymo Research) - MethylSEQR (Applied Biosystems) - EpiTect Bisulfite (Qiagen)
	1 kit et 3 protocoles	- Universal Methylated DNA Standard (Zymo Research). - Hydrolyse en nucléosides et analyse HPLC - Séquençage au bisulfite - Methyl-sensitive PCR
<b>2. Conception des amorces PCR</b>  <b>et</b> <b>Amplification PCR spécifique</b>	2 logiciels	- Methyl Primer Express (Applied Biosystems) - Eprimer3 (Institut Pasteur)
	5 protocoles	- PCR gradient - Protocole standard (RedTaq, Sigma) - Protocole alternatif 1 (enzyme HotStarTaq®, Qiagen) - Protocole alternatif 2 (préamplification avec l'amorce sens) - Protocole alternatif 3 (programme "touchdown")
<b>3. Purification des amplicons PCR</b> <b>et</b> <b>Purification des produits de la réaction de séquence</b>	2 kits	- MinElute® (Qiagen) - ExoSAP-IT® (USB Corporation)
	2 kits et 1 protocole	- Précipitation à l'éthanol - CENTRI-SEP (Applied Biosystems) - BigDye® XTerminator (Applied Biosystems)

## 5.2. Criblage des marqueurs épigénétiques

Le traitement de l'ADN génomique au bisulfite de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) permet de convertir les cytosines non méthylées en uraciles (Us)(Figure 33A). Dans ces conditions, les cytosines méthylées ne subissent aucune modification. Ainsi, après amplification par PCR, les uraciles correspondant préalablement aux cytosines non méthylées, sont remplacées par des thymines (Figure 33B) alors que les cytosines méthylées sont remplacées par des cytosines dans les produits PCR. Le séquençage des produits PCR permet, par comparaison avec la même séquence d'ADN non traitée au bisulfite (Figure 33C), de déterminer le statut de méthylation de chaque cytosine et ceci de façon quantitative. En effet, pour une même position, la proportion de cytosine et de thymine dans la séquence traitée au bisulfite, permet de déterminer le pourcentage de méthylation de la cytosine dans l'ADN génomique de départ. Le problème est qu'il faut pouvoir s'assurer du taux de conversion des Cs en Us, sinon l'interprétation sera fautive. En effet, cette étape est en particulier rendue complexe par le fait que chez les plantes toutes les cytosines peuvent être méthylées, contrairement aux animaux, sur lesquels ont été mis au point les différents kits d'analyse. D'une manière générale, aucune procédure de vérification n'est effectuée ou mentionnée par les utilisateurs dans les articles hormis la "Methyl-Sensitive PCR" (MS-PCR) sur quelques sites de restriction. La mise au point technique d'un test de criblage fiable de biomarqueurs épigénétiques chez les plantes (profils de méthylation par la méthode du séquençage bisulfite) a nécessité la comparaison de l'efficacité de divers kits commercialisés, de protocoles publiés ou non et la mise au point de témoins expérimentaux (Tableau 6).

Ce travail a été réalisé lors de l'encadrement des stages de deux étudiants de Master 2 (Mlle Carole Latruwe et M. Clément Lafon-Placette, Mars-Septembre 2008). Après une présentation détaillée des méthodes utilisées pour la mise au point du criblage des marqueurs épigénétiques, les résultats obtenus pour les biomarqueurs de la morphogenèse *in vitro* de la betterave sucrière seront présentés.



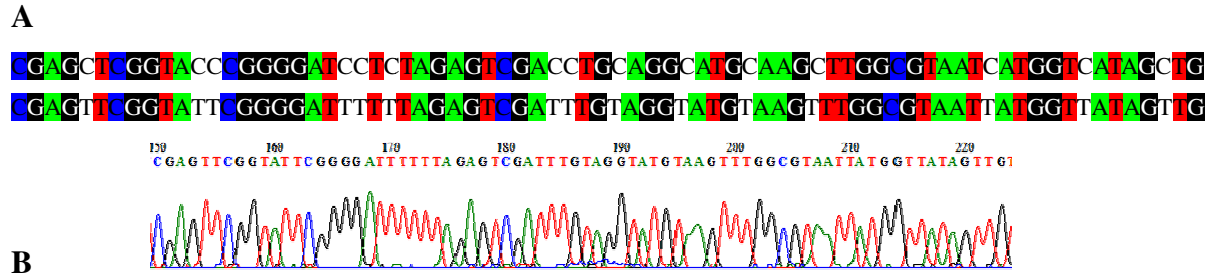
### **5.2.1. Méthodes**

#### *5. 2. 1. 1. Traitement de l'ADN génomique au bisulfite de sodium*

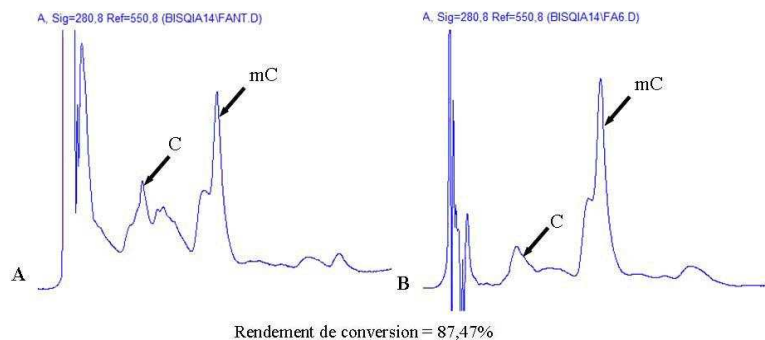
Les trois kits disponibles sur le marché ont été utilisés en suivant les conditions de chaque fournisseur : le kit EZ DNA methylation Gold (Zymo Research, Etats-Unis), le kit methylSEQR (Applied Biosystems, France) et le kit EpiTect Bisulfite (Qiagen, France). Afin de comparer leur efficacité de conversion des cytosines en uraciles, deux tests ont été réalisés. Le premier à l'aide d'un témoin de conversion commercialisé, il s'agit d'Universal Methylated DNA Standard (Zymo Research, Figure 34). Le deuxième test consiste à estimer directement sur l'ADN végétal, après hydrolyse en nucléosides et séparation par HPLC, le pourcentage de conversion des cytosines en uraciles (Figure 35 ; Causevic *et al.*, 2005). Différentes quantités d'ADN (125 ng, 250 ng et 500 ng) ainsi que différentes durées d'incubation avec le bisulfite (2h30, 6h et 16h) ont été testées. Les conditions optimales de conversion ont ainsi été établies pour chaque kit et les résultats ont été comparés pour choisir le kit le plus efficace dans nos conditions.

Le kit EpiTect Bisulfite a donné un meilleur taux de conversion et a donc été utilisé par la suite. En bref, 130  $\mu$ L du réactif de conversion sont ajoutés à 10  $\mu$ L d'ADN génomique (500 ng). Les tubes sont agités pendant 1 min à température ambiante. Ils sont ensuite incubés dans un thermocycleur : 5 min à 99°C, 25 min à 60°C, 5 min à 99°C, 85 min à 60°C, 5 min à 99°C et 175 min à 60°C. Cette étape permet de dénaturer l'ADN et de convertir les cytosines en uracile-sulfonate (Figure 36). Les 140  $\mu$ L de l'échantillon sont centrifugés 1 min à 14 000 *g* et le surnageant est additionné de 560  $\mu$ L d'une solution "carrier RNA" qui améliore la capacité de l'ADN traité à se fixer à la colonne de purification. Ce mélange est ensuite placé dans une colonne fournie dans le kit, posée sur un tube collecteur, puis centrifugé à 14 000 *g* pendant 1 min. L'éluat est jeté. Puis, 500  $\mu$ L de tampon de lavage sont ajoutés sur la colonne qui est alors centrifugée à 14 000 *g* pendant 1 min. L'éluat est jeté. 500  $\mu$ L de tampon de désulfonation sont ajoutés sur la colonne, ce tampon élimine les groupements sulfonates des uraciles. L'ensemble est incubé 15 min à température ambiante. Le tube est ensuite centrifugé à 14 000 *g* pendant 1 min. Puis, la colonne est lavée deux fois en ajoutant 500  $\mu$ L de tampon de lavage suivi d'une centrifugation à 14 000 *g* pendant 1 min. L'ADN est élué par ajout de 20  $\mu$ L de tampon d'élution sur la membrane de la colonne. Celle-ci est placée sur un tube collecteur de 1,5 mL qui sera centrifugé à 14 000 *g* pendant 2 min. Une deuxième élution est réalisée dans des conditions identiques, puis réunie avec la première. L'ADN traité au

bisulfite est conservé à -20°C pendant 12 semaines. 10 µL d'éluat permettent de réaliser 5 PCR.



**Figure 34.** Fragment de la séquence amplifiée par PCR du plasmide pUC19 : A) Séquences du plasmide pUC19 non traité (en haut) et traité au bisulfite (en bas). Les bases surlignées en couleurs indiquent les nucléotides identiques entre les deux séquences ; B) Électrophorégramme de la séquence après traitement au bisulfite du plasmide pUC19.



**Figure 35.** Chromatogrammes d'analyse par HPLC de l'hydrolyse d'un ADN génomique extrait de cal de betterave sucrière traité (B) ou non (A) au bisulfite. Les pics correspondant à la cytosine (C) et la méthylcytosine (mC) sont indiqués par des flèches. Le rendement de conversion est calculé par la formule suivante : (quantité de cytosine dans l'ADN traité au bisulfite / quantité de cytosine dans l'ADN non traité au bisulfite) x 100. La quantité de méthylcytosine est inchangée entre les deux chromatogrammes.



### 5.2.1.2. Conception d'amorces oligonucléotidiques pour l'amplification par PCR

L'élaboration *in silico* d'amorces amplifiant les marqueurs étudiés s'est faite dans un premier temps à l'aide du logiciel Methyl Primer Express v1.0 (Applied Biosystems, <https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=6024121>). En raison de problèmes, notamment d'auto-hybridation des amorces désignées ; un autre logiciel destiné à la conception d'amorces, Eprimer3 (Institut Pasteur, <http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/MobylyePortal/portal.py?form=eprimer3>), a été utilisé et a permis de concevoir des amorces avec de meilleures caractéristiques thermodynamiques qui ont en effet permis une amplification par PCR des séquences de betterave sucrière.

La présence de cytosines dans la séquence d'hybridation avec l'amorce est inévitable pour obtenir de bonnes caractéristiques thermodynamiques de l'amorce. Il est alors nécessaire, pour minimiser les problèmes de mésappariement avec l'ADN traité au bisulfite, d'utiliser des amorces dégénérées avec Y = C ou T, et R = A ou G, remplaçant respectivement les cytosines sur l'amorce sens et les guanines sur l'amorce antisens au niveau des trois derniers nucléotides de l'extrémité 3'-OH de l'amorce par laquelle s'initie l'élongation par la Taq ADN Polymérase.

Enfin, la séquence correspondant à l'amorce universelle M13 sens ou antisens est ajoutée à l'extrémité 5'-P de chaque amorce spécifique d'une séquence de betterave sens ou antisens respectivement. Cet ajout permet un séquençage direct des produits PCR par les amorces universelles M13 (Figure 36). Les amorces allongées M13 et partiellement dégénérées sont utilisées pour les amplifications sur ADN génomique traité ou non au bisulfite. Les amorces sans élongation M13 et non dégénérées sont utilisées pour les PCR sur ADNc. La figure 36 résume la stratégie utilisée pour l'amplification de deux épiallèles sur ADN traité au bisulfite.

**Etape 1 :** Deux ADN sont traités au bisulfite, convertissant les bases cytosines non méthylées en bases uraciles.

**Etape 2 :** Elongation sens. L'état de méthylation des cytosines de l'ADN traité étant inconnu, il est impossible de savoir si l'endroit de l'ADN où s'hybrident les amorces amplifiant une partie du locus est composé de cytosines ou d'uraciles après traitement au bisulfite. Dans le cas où les cytosines sont converties, il y a mésappariement entre les bases guanines (G) des amorces et les bases uraciles (U) de l'ADN traité. Pour assurer une hybridation correcte de l'amorce antisens, celle-ci est dégénérée sur les trois derniers nucléotides en 3'-OH, extrémité par laquelle s'initie l'élongation. Ainsi, un nucléotide R=A ou G remplace un G. De cette manière, quelle que soit la base complémentaire sur l'ADN

matrice traité au bisulfite (méthylcytosine→cytosine ou cytosine→uracile), une hybridation spécifique est favorisée.

**Etape 3 :** Elongation antisens. De la même façon, pour s'assurer d'une hybridation correcte de l'amorce sens sur le brin synthétisé à partir de l'amorce antisens, il est nécessaire de dégénérer l'amorce sens sur les trois derniers nucléotides en 3'-OH avec Y= T ou C remplace C. En effet, par complémentarité avec les uraciles ou les cytosines de l'ADN matrice traité au bisulfite, le brin synthétisé à partir de l'amorce antisens peut posséder des bases adénines ou guanines respectivement.

**Etape 4 :** Suite de l'amplification PCR.

**Etape 5 :** Le produit PCR, grâce à ses extensions M13, est séquencé en utilisant les amorces universelles M13 sens ou antisens.

#### *5.2.1.3. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)*

Les amplifications par PCR ont été effectuées sur des matrices différentes :

- ADN génomique traité ou non au bisulfite en vue du séquençage pour la détermination du profil de méthylation des marqueurs.
- ADN génomique traité ou non au bisulfite et digéré par des enzymes sensibles à la méthylation avant l'amplification PCR. Cela permet une confirmation du séquençage bisulfite.
- ADNc de façon semi-quantitative (RT-PCR) en vue d'estimer l'expression des marqueurs.

**Tableau 7.** Différentes concentrations testées pour trois réactifs de PCR : le MgCl<sub>2</sub>, l'ADN et les amorces.

<b>Réactifs</b>	<b>MgCl<sub>2</sub></b>	<b>Matrice ADN</b>	<b>Amorces</b>
<b>Intervalle de concentrations testées</b>	1,5 mM à 5 mM	0,25 µM à 50 µM	0,1 µM à 1 µM
<b>Concentration retenue</b>	2,5 mM	25 µM	0,25 µM

### **1. Amplification PCR sur ADN génomique traité ou non au bisulfite**

Suite à diverses mises au point, une procédure de PCR standard a été établie. Pour les amplifications plus délicates, trois alternatives ont été définies.

**Protocole standard :** Pour ce programme, différentes quantités d'ADN, de  $MgCl_2$  et d'amorces ont été testées jusqu'à obtention des conditions optimales (Tableau 7), utilisées pour tous les autres programmes. Les PCR ont été effectuées dans un volume de 20  $\mu$ L avec les concentrations finales suivantes pour les réactifs : tampon PCR (x1),  $MgCl_2$  (2,5 mM pour l'ADN plasmidique), dNTP (0,2 mM), amorces sens et antisens (0,25  $\mu$ M chacune), une unité d'ADN polymérase REDTaq<sup>®</sup> (Sigma, France). La quantité d'ADN utilisée est de 500 ng. Les thermocycleurs cités précédemment ont été utilisés avec le programme suivant : une phase de dénaturation à 95°C pendant 5 min, puis 40 cycles comprenant 30 s à 95°C, 2 min à la température d'hybridation des amorces (définie au préalable par le protocole de PCR gradient décrit ci-dessus) et 2 min à 72°C, puis une dernière phase d'élongation à 72°C pendant 5 min.

**Protocole alternatif 1 :** Dans le cas où ce protocole ne donnait aucun amplicon, une autre ADN polymérase, la HotStarTaq<sup>®</sup> (Qiagen) a été utilisée. Cette enzyme n'est activée qu'après exposition à une forte température (95°C pendant au moins 5 min), évitant les hybridations et les élongations à des températures non spécifiques. Dans ce cas, les réactifs sont utilisés dans un volume de 20  $\mu$ L avec les concentrations finales suivantes : solution Q, facilitant l'hybridation des amorces (1x), tampon PCR *Coral* (1x),  $MgCl_2$  (1,5 mM), dNTP (0,2 mM), amorces sens et antisens (0,2  $\mu$ M) et 0,5 unité de HotStarTaq<sup>®</sup>. Les mêmes thermocycleurs que précédemment ont été utilisés avec le programme suivant : 15 min à 95°C, puis 40 cycles de 30 s à 94°C, 1 min à  $T_m$ , et 1 min à 72°C, suivis par une phase d'élongation à 72°C de 10 min.

**Protocole alternatif 2 :** Afin de minimiser encore plus la formation de dimères entre les amorces et des hybridations non spécifiques, une pré-amplification avec une seule amorce est réalisée suivie de cycles d'amplification à des températures bien supérieures à la  $T_m$  95°C pendant 5 min, puis 5 cycles, réalisés avec une seule amorce, comprenant 20 s à 95°C, 3 min à  $T_m+8^\circ C$  et 3 min à 72°C. Après ajout de la seconde amorce, 10 cycles comprenant 20 s à 95°C, 1 min 30 secondes à  $T_m+8^\circ C$  et 2 min à 72°C sont effectués. Enfin, 30 derniers cycles de 20 s à 95°C, 1 min 30 s à  $T_m-2^\circ C$  et 2 min à 72°C sont suivis par 10 min à 4°C.

**Protocole alternatif 3 :** Un dernier programme appelé "touchdown" a été utilisé dans les cas où la température d'hybridation des amorces était difficile à définir car elle

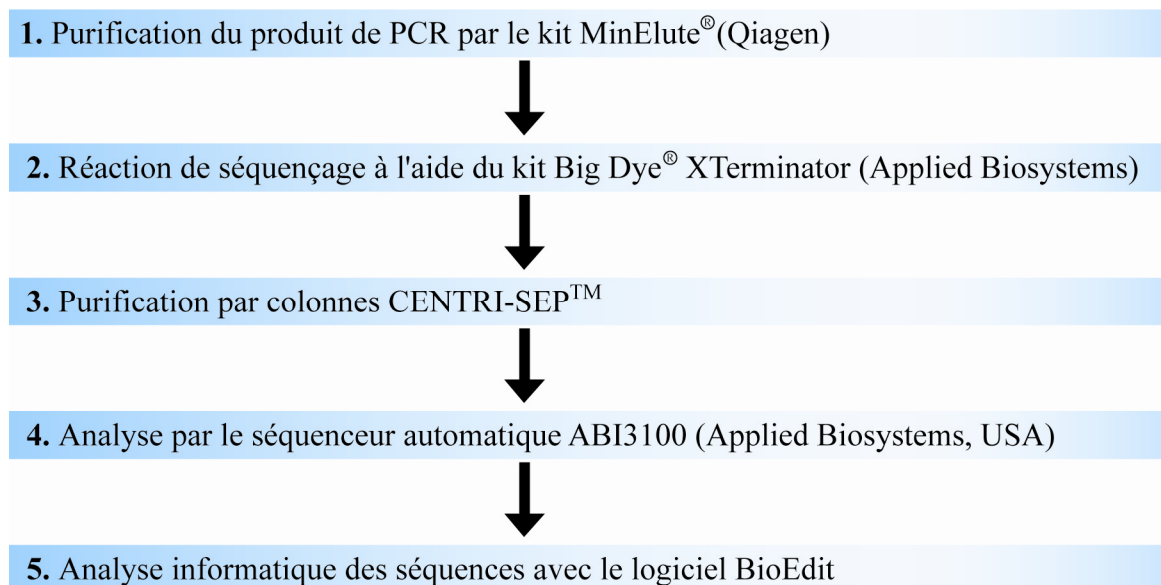
dépendait du nombre de cytosines converties en uraciles au niveau de la séquence de fixation de l'amorce. Le programme suivant a donc été utilisé avec des paliers de température : 80°C pendant 1 min, 94°C pendant 1 min, 8 cycles comprenant 1 min à 95°C, 1 min à  $T_m+2^\circ\text{C}$  pour les deux premiers cycles et une diminution de 1°C tous les deux cycles jusqu'à  $T_m-1^\circ\text{C}$ , 1 min à 72°C et 40 derniers cycles à température d'hybridation  $T_m-2^\circ\text{C}$  suivis de 5 min à 72°C.

## **2. Amplification PCR après digestion par des enzymes de restriction sensibles à l'état de méthylation ou MS-PCR**

500 ng d'ADN génomique traité ou non au bisulfite ont été digérés pendant 2 h à 37°C par 10 U d'enzymes *Hpa* II ou *Msp* I (Sigma), en présence de BSA (100 µg/mL), du tampon de l'enzyme et d'eau ultrapure dans un volume final de 40 µL. Le mélange est ensuite inactivé 15 min à 65°C. Les fragments de restriction sont purifiés par précipitation à l'éthanol. L'amplification PCR est réalisée dans les conditions du protocole standard décrit ci-dessus.

### *5.2.1.4. Séquençage et analyse des séquences*

Plusieurs étapes, de la préparation des produits à séquençer jusqu'à leur séquençage, ont été optimisées (Figure 37) :



---

**Figure 37.** Les étapes allant de la production de l'amplicon PCR jusqu'à l'analyse de sa séquence.

**1. Purification des amplicons PCR.** La réaction de séquençage permet l'élongation dans un seul sens sur une matrice ADN et utilise des dNTP marqués avec des fluorophores spécifiques à chaque type de nucléotide (méthode dite des "Dyes Terminator"). Pour que cette élongation se fasse uniquement sur l'amplicon recherché, les produits PCR ont été purifiés en éliminant toute amorce en excès et ADN simple brin qui pourraient servir de matrice de fixation aux amorces M13 (utilisées pour la PCR séquençage). Deux protocoles de purification ont été testés sur 4 séquences en suivant les recommandations de chaque fournisseur : - l'ExoSAP-IT<sup>®</sup> (USB Corporation, USA), mélange de deux enzymes : l'exonucléase I et une phosphatase alcaline de crevette,

- le kit de purification MinElute<sup>®</sup> (Qiagen).

Le kit MinElute<sup>®</sup> a donné des séquences avec un bruit de fond moindre et une meilleure résolution et a donc été utilisé par la suite.

**2. Réaction de séquençage.** Les réactions de séquençage ont été effectuées suivant le protocole préconisé par Applied Biosystems pour le kit de séquençage BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 : le milieu réactionnel d'un volume total de 10 µL, composé de tampon BigDye<sup>®</sup> Terminator (x1,5), 1 µL de mélange réactionnel BigDye<sup>®</sup> Terminator, d'amorce M13 sens ou antisens (0,5 µM) et 2 µL de produit PCR purifié, a été placé dans un des thermocycleur cités précédemment pour le programme suivant : 96°C pendant 1 min, 25 cycles de 96°C pendant 10 s, 50°C pendant 5 s et 60°C pendant 4 min.

**3. Purification des produits de séquençage sur colonne CENTRI-SEP<sup>TM</sup>.** Les produits de séquençage ont ensuite été purifiés afin d'éliminer tous dNTP marqués, amorces ou autres réactifs en excès. Trois procédés ont été testés sur 4 amplicons identiques : la purification par colonne CENTRI-SEP<sup>TM</sup> (Applied Biosystems), le réactif BigDye<sup>®</sup> XTerminator<sup>TM</sup> (Applied Biosystems) et la précipitation à l'éthanol. Les colonnes CENTRI-SEP<sup>TM</sup> ont donné de meilleurs résultats en termes de faiblesse d'intensité du bruit de fond et de proportion de séquences réussies et ont donc été retenues. Le protocole adopté est le suivant : les colonnes contiennent du Sephadex déshydraté auquel 800 µL d'eau ultrapure ont été ajoutés. Après 30 min, l'eau en excès a été enlevée à l'aide d'une poire, puis la colonne a subi une centrifugation à 3 000 g pendant 2 min. Le produit de séquençage a alors été déposé sur la résine avant de subir une centrifugation identique.

**4. Analyse par séquenceur automatique.** L'éluat a ensuite été récupéré et analysé sur le séquenceur automatique ABI 3100 (Applied Biosystems).

**5. Analyse informatique des séquences.** Pour chaque marqueur, les séquences ont été analysées sous forme d'électrophorégrammes et alignées entre-elles à l'aide de la fonction



Multiclustalw du logiciel "BioEdit Sequence Alignment Editor" v7.0.9.0 (disponible sur <http://www.mbio.ncsu.edu/Bioedit/Bioedit.html>). L'alignement de séquences amplifiées à partir d'ADN traité ou non a permis d'étudier les mutations ponctuelles des cytosines (C) en thymines (T). Le pourcentage de C et de T (et donc de méthylcytosine et cytosine respectivement) a été établi par mesure sur les électrophérogrammes des pics de fluorescence des C et des T sur une position cytosine donnée à l'aide du logiciel Bioedit. Les cytosines et thymines ne possédant pas forcément les mêmes fluorescences, le logiciel "KB™ Basecaller" version 1.4 (Applied Biosystems) est utilisé. Afin d'ajuster cette correction, il est encore possible d'établir un facteur "a" ajustant la valeur du signal moyen de thymine ou "T" (les 10 plus fortes pour une séquence donnée) permettant d'obtenir la même relation signal/quantité que pour les cytosines ou "C" (les 10 plus fortes pour une séquence donnée). Pour calculer le pourcentage de méthylation à une position donnée de la séquence, il faut alors multiplier la valeur du signal "T" par "a". Le taux de conversion des cytosines non méthylées en uraciles mesuré par analyse HPLC est appelé "b" (compris entre 0 et 1). La valeur corrigée de "T" est donc multipliée par 1/b. Cependant, une quantité "(1-b) x Ta" de cytosines non méthylées et non converties doit être soustraite à la valeur mesurée "C". Ces valeurs corrigées peuvent alors être utilisées pour calculer le pourcentage de méthylation comme décrit précédemment (HPLC). Certaines séquences ont été refaites à partir d'une nouvelle amplification PCR pour confirmer la fiabilité de l'analyse. Par exemple, si a=1 et b=2/3 (nos conditions), alors la formule permettant de déterminer le pourcentage de méthylcytosine pour une position cytosine donnée est la suivante :

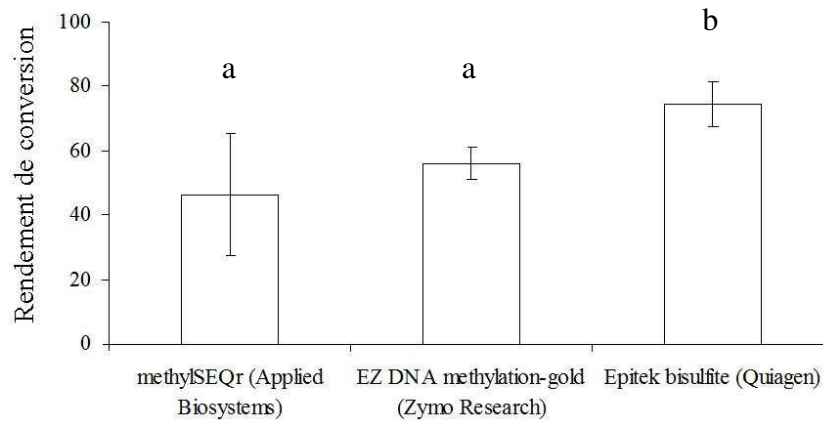
$$\% \text{ méthylation} = \frac{C - (T \cdot 0,5)}{(T \cdot 1,5) + [C - (T \cdot 0,5)]} \times 100.$$

## 5.2.2. Résultats

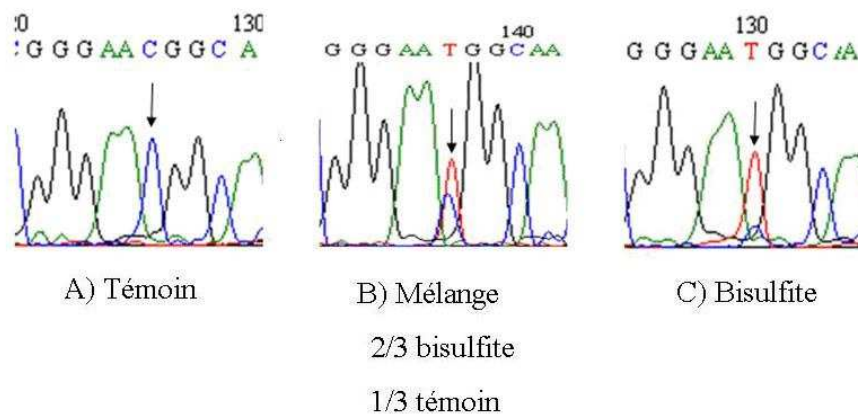
### 5.2.2.1. Traitement au bisulfite et vérifications

Pour pouvoir déterminer le pourcentage de méthylation d'une cytosine et consécutivement déterminer la profil de méthylation précis d'une séquence, l'ADN extrait doit être préalablement traité au bisulfite de sodium. Ce traitement va convertir les cytosines non méthylées en uraciles (Figure 33A) mais n'induit aucune modification des méthylcytosines. Ainsi, après amplification par PCR, les uraciles sont remplacées par des thymines (Figure 33B) alors que les méthylcytosines sont remplacées par des cytosines dans les produits PCR. Après séquençage, la comparaison des produits PCR traité et non traité au bisulfite (Figure 33C) permet de déterminer le pourcentage de méthylation de chaque cytosine.

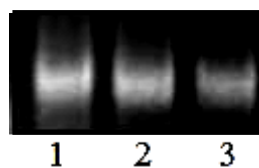
Pour réaliser les traitements de l'ADN génomique au bisulfite, trois kits ont été utilisés en suivant les prescriptions de chaque fournisseur : le kit EZ DNA methylation Gold (Zymo Research, Etats-Unis), le kit methylSEQR (Applied Biosystems, France) et le kit EpiTect Bisulfite (Qiagen, France). L'efficacité de ces trois kits (rendement de conversion des cytosines en uraciles) a été estimée à l'aide de deux expériences. La première correspond à l'utilisation d'un kit commercialisé "Universal Methylated DNA Standard" (Zymo Research). Il correspond au plasmide pUC 19 dont toutes les cytosines des dinucléotides CG ont été méthylées enzymatiquement, alors que les autres cytosines sont non méthylées (Figure 31). Le séquençage d'une zone de 466 pb, avec des amorces fournies, a permis de calculer un rendement de conversion nommé "a". Ce témoin permet d'estimer la qualité des réactifs du kit ("a" est proche de 100 % pour les 3 kits), mais ne reflète pas les caractéristiques d'un ADN génomique eucaryote de plantes (grande taille, environ 780 Mpb pour la betterave sucrière) qui est fréquemment contaminé par des polysaccharides ou des composés phénoliques. Le deuxième essai consiste donc à estimer directement sur l'ADN végétal, après hydrolyse en nucléosides et séparation par HPLC, le rendement de conversion des cytosines en uraciles (Figure 10 ; Causevic *et al.*, 2005). Différentes quantités d'ADN (125 ng, 250 ng et 500 ng) ainsi que différentes durées d'incubation avec le bisulfite (2h30, 6h et 16h) ont été testées.



**Figure 38.** Histogrammes représentant la comparaison des rendements de conversion des cytosines de l'ADN génomique en uraciles après traitement au bisulfite avec trois kits. Les données sont des moyennes  $\pm$  ES ( $n > 5$ ). Les lettres distinctes indiquent des différences significatives entre les moyennes ( $P \leq 0,05$ ).



**Figure 39.** Électrophorégrammes de la même séquence d'ADN génomique amplifiée par PCR. La séquence provient du produit de PCR amplifié à partir de : A) ADN non traité ; B) un mélange ADN non traité et traité au bisulfite (1:2) (v/v) ; C) ADN traité au bisulfite.



**Figure 40.** Amplification par MS-PCR d'une séquence d'ADN génomique du marqueur 12. L'ADN a été préalablement digéré par : 1) *MspI* ; 2) *HpaII* ou 3) non digéré.

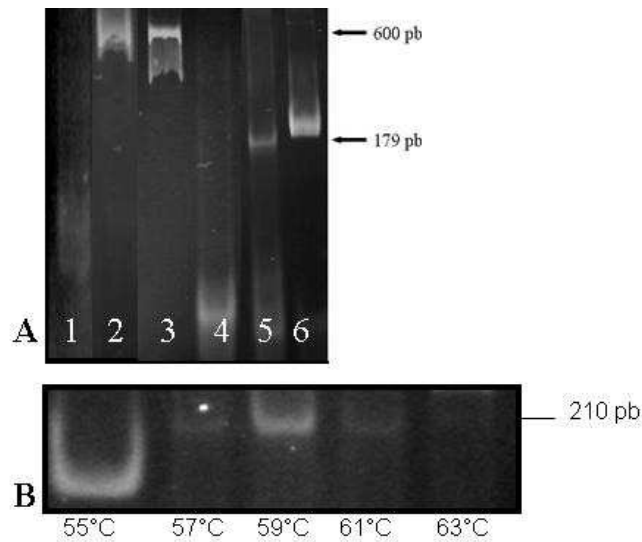
Les conditions optimales de conversion ont ainsi été établies pour chaque kit. Les résultats ont été comparés pour choisir le kit le plus efficace dans nos conditions (Figure 38). Le kit EpiTect Bisulfite a donné un rendement de conversion (environ 75%) significativement supérieur aux deux autres kits et la meilleure reproductibilité sur des essais indépendants ( $n > 5$ ). Il a donc été utilisé par la suite. Le taux de conversion est également utile pour corriger les valeurs obtenues sur les électrophorogrammes des séquences.

Afin de vérifier si la proportion de cytosines et de thymines pour une position donnée sur les électrophorogrammes de séquences reflète les proportions de départ au niveau de ce site dans l'ADN, un mélange en proportions déterminées de produits de PCR sur ADN traité et non traité au bisulfite a été séquencé. Les analyses (Figure 39) ont confirmé le caractère quantitatif de cette analyse.

Une dernière vérification de cette méthode au bisulfite, consiste à réaliser une MS-PCR en utilisant deux enzymes *Hpa* II ou *Msp* I qui sont des isoschizomères reconnaissant le site CCGG. *Hpa* II ne coupe pas si l'une des cytosines est méthylée. *Msp* I ne coupe que si la première cytosine n'est pas méthylée. Suivant l'état de méthylation du site CCGG, il y a donc coupure ou non au niveau de l'ADN génomique et donc amplification PCR d'un fragment qui contient ce site ou non. Un exemple est présenté sur la figure 40. Le séquençage au bisulfite de ce marqueur indiquait une méthylation des deux cytosines du site CCGG. La MS-PCR confirme l'absence de digestibilité de ce site par les deux enzymes et donc la nature méthylée de la séquence.

#### 5.2.2.2. Conception des amorces PCR et amplification PCR spécifique

Le logiciel Methyl Primer Express permet de déterminer la séquence d'amorces s'hybridant sur l'ADN matrice traité au bisulfite en minimisant les cytosines en dinucléotides CG, seul site de méthylation chez les animaux, alors que chez les plantes toutes les cytosines sont susceptibles d'être méthylées. Des tests d'amplification par PCR à l'aide des amorces définies par ce logiciel sur une vingtaine de séquences de betterave sucrière n'ont jamais permis d'amplification (Figure 41A piste 1). Une analyse par le logiciel NetPrimer de leurs caractéristiques thermodynamiques (température d'hybridation ( $T_m$ ), stabilité ( $\Delta G$ ) des structures secondaires telles que des homo- ou hétéro-dimères ou des boucles ("harpins") et la stabilité de l'hybridation ( $\Delta G$ ) de l'amorce aux extrémités 3'OH et en 5'P) a révélé de graves lacunes.



**Figure 41.** Image numérisée d'un gel d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide révélé au BET illustrant la mise au point des amplifications PCR : A) amplification de divers marqueurs à l'aide de plusieurs protocoles : 1) amplification avec des amorces conçues avec le logiciel MethylPrimer Express montrant la formation de dimères de taille comprise entre 80 et 150 pb empêchant une amplification correcte des séquences souhaitées ; 2) amplification spécifique d'une bande de 600 pb avec des amorces pour le même marqueur mais conçues avec le logiciel Eprimer 3 ; 3) autre marqueur de 600 pb amplifié avec le protocole alternatif 2 ou avec le protocole standard 4 ; 5) marqueur de 179 pb amplifié avec le protocole standard ou avec le protocole alternatif 1 (6) ; B) amplification d'un marqueur de 210 pb à différentes  $T_m$  (55 à 63°C)

Un autre logiciel destiné à la conception d'amorces mais non spécialisé pour l'étude de la méthylation, Eprimer3, a alors été utilisé et a permis de concevoir des amorces avec de meilleures caractéristiques thermodynamiques qui ont en effet permis d'optimiser l'amplification des marqueurs à partir d'une matrice traitée au bisulfite. Plusieurs protocoles PCR ont été utilisés en faisant varier la température d'hybridation ( $T_m$ ) des amorces, la concentration de certains réactifs (Tableau 7), le type d'ADN polymérase, et/ou les programmes du thermocycleur. La valeur donnée par le logiciel NetPrimer de la  $T_m$  est théorique. De plus, les extensions M13 des amorces rendent plus difficile l'évaluation de la valeur de la  $T_m$ . C'est pourquoi il a fallu pour chaque marqueur déterminer la  $T_m$  la plus spécifique possible permettant l'hybridation des amorces avec l'ADN et ceci par une PCR à gradient, c'est-à-dire une PCR où la température varie autour de la valeur théorique ( $T_{m_{th}} - 6^\circ\text{C}$ ,  $T_{m_{th}} - 4^\circ\text{C}$ ,  $T_{m_{th}} - 2^\circ\text{C}$ ,  $T_{m_{th}}$ ,  $T_{m_{th}} + 2^\circ\text{C}$ ,  $T_{m_{th}} + 4^\circ\text{C}$  et  $T_{m_{th}} + 6^\circ\text{C}$ ). Après analyse sur gel d'électrophorèse des amplicons obtenus pour les différentes températures testées, la température amenant à l'amplification la plus spécifique (amplicon de taille attendue uniquement) et la plus importante (intensité du signal de l'amplicon la plus forte) a pu être choisie. Un exemple est montré sur la Figure 41B où la bande correspondant à l'amplicon attendu est celle de plus forte intensité (59°C).

Les différents protocoles de PCR réalisés (Tableau 6) ont permis de proposer une procédure de PCR standard. Pour les amplifications plus délicates dues à la conversion des cytosines non méthylées en uraciles et diminuant ainsi la complémentarité entre amorces et ADN matrice, trois alternatives ont été définies. Par exemple, le protocole alternatif qui est basé sur l'utilisation de l'ADN polymérase "HotStar" a permis d'obtenir des amplifications par PCR plus spécifiques et plus importantes (Figure 41A, piste 3). Dans le cas où ce protocole n'a pas résolu les problèmes de dimères et/ou de mésappariements, les protocoles alternatifs 2 et 3 ont été utilisés (Figure 41 pistes 3 et 6).

### 5.2.2.3. Purification des amplicons PCR et purification des produits de la réaction de séquençage.

La purification des produits de PCR avant la réaction de séquençage a été optimisée en comparant l'efficacité de deux kits ("Exo-SAP-IT" et "MinElute") sur quatre amplicons. La purification par ce dernier a permis d'obtenir des séquences plus lisibles. Trois procédés de purification des produits de séquençage ont été testés sur 4 séquences différentes : "BigDye X-Terminator<sup>TM</sup>", par précipitation à l'éthanol et à l'aide des colonnes "CENTRI-SEP<sup>TM</sup>". L'analyse des séquences purifiées à l'aide de ces trois procédés a montré que les colonnes "CENTRI-SEP<sup>TM</sup>" constituaient le procédé le plus fiable (Figure 42).

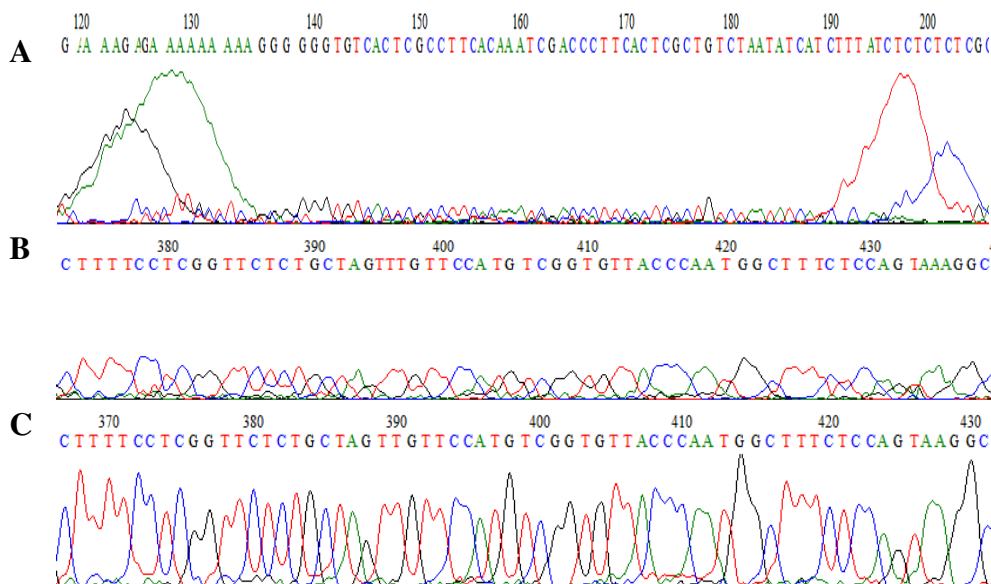


Figure 42. Électrophorégrammes de séquences purifiées : A) avec le réactif "BigDye X-Terminator<sup>TM</sup>" ; B) à l'éthanol ; C) à l'aide des colonnes "CENTRI-SEP<sup>TM</sup>".

#### 5.2.2.4. Profils de méthylation des marqueurs

Les amorces conçues pour amplifier les biomarqueurs ont été testées sur de l'ADN génomique de la lignée O. Les amplicons PCR obtenus ont ensuite été séquencés afin d'obtenir leur profil de méthylation. Le pourcentage de méthylation pour chaque cytosine de la séquence est ensuite calculé. Afin de faciliter les interprétations, trois seuils de méthylation ont été arbitrairement fixés : (1) de 0 à 30% (blanc) ; (2) de 30 à 70% (gris) et (3) de 70 à 100% (noir). De plus, les différents contextes des cytosines CG, CNG ou CHH sont indiqués par des symboles différents. Ainsi, les profils de méthylation des marqueurs de méthylation 12, 14 et du gène candidat SOD ont pu être réalisés pour la lignée O. Ces résultats préliminaires sont présentés à titre d'exemple (Figure 43).

#### Marqueur de méthylation n°12



#### Marqueur de méthylation n°14



#### Marqueur SOD



**Figure 43.** Profils de méthylation chez une lignée organogène (O) de betterave sucrière, des marqueurs 12 et 14 isolés par RLGS et du marqueur SOD. Les contextes de méthylation CG, CNG (N = A, T, C ou G) et CHH (H = A, T ou C) sont représentés respectivement par des ronds, des triangles et des carrés. Une cytosine sera considérée comme méthylée pour un pourcentage supérieur à 70% (noir), comme présentant un niveau intermédiaire de méthylation pour un pourcentage compris entre 30 et 70% (gris) et comme non méthylée pour un pourcentage inférieur à 30% (blanc).

Les séquences des trois marqueurs sont hyperméthylées. Seules quelques cytosines situées indistinctement dans les trois contextes possibles (CG, CNG et CHH) sont hypométhylées pour les 3 marqueurs testés. Les séquences des marqueurs 12 et 14 sont associées à des îlots CpG. Bien que les îlots CpG associés aux gènes soient hypométhylés chez les animaux (Razin, 1998 ; Antequera et Bird, 1999 ; Jones, 1999 ; Ashikawa, 2001 ; Li *et al.*, 2001), chez le riz l'état de méthylation de ces séquences dépend de la position de l'îlot par rapport à la séquence du gène associé (Ashikawa *et al.*, 2001). Ainsi, nous décrivons pour la première fois à notre connaissance des gènes associés à des îlots CpG méthylés chez une lignée cellulaire de betterave sucrière.

Pour achever le criblage de ces marqueurs en tant que biomarqueurs de la morphogenèse, une analyse de leur profil de méthylation devra être réalisée sur d'autres lignées cellulaires telles que NO et DD.





## 5. Discussion et perspectives (**Contrat de recherche 222N avec SES-VanderHave et projet de publication n°3**).

La complexité du développement des plantes et sa régulation ont fait l'objet de nombreuses études ces dernières années (Reyes, 2006 ; Exner et Henning, 2008 ; Farrona *et al.*, 2008). De nombreux mécanismes contrôlant le développement des plantes ont été découverts et en particulier le rôle du contrôle épigénétique a été mis en évidence. Le terme épigénétique réfère au fait que ce mécanisme contrôle l'expression de gènes *via* des modifications de la chromatine qui n'induisent pas d'effets mutationnels comme par exemple la méthylation de l'ADN ou la modification des histones (Turner, 2001 ; Meyer, 2001). De nombreux progrès ont permis de relier ces phénomènes avec l'appartenance à une lignée cellulaire ou un état développemental défini chez les animaux ou chez les plantes (Razin et Shemer, 1995). Néanmoins, peu de connaissances sont disponibles sur les relations entre la variation de ces paramètres épigénétiques et la différenciation, la dédifférenciation et l'organogenèse chez les plantes (Verbsky et Richards, 2001 ; Goodrich et Tweedie, 2002 ; Li *et al.*, 2002). En particulier, peu de données sont publiées sur la plasticité développementale des plantes, les changements de phénotype et les variations quantitatives de ces paramètres épigénétiques (Lambé *et al.*, 1997 ; Goodrich et Tweedie, 2002 ; Joyce *et al.*, 2003 ; Causevic *et al.*, 2005 ; Nakabayashi *et al.*, 2005). De plus, les loci cibles de ces variations sont peu connus et n'ont jamais été utilisés comme marqueurs moléculaires de la morphogenèse. Chez les animaux, ce polymorphisme de méthylation suscite un grand intérêt et des études sont en cours afin de trouver des biomarqueurs de cellules cancéreuses (Laird, 2003). Chez les plantes, aucune recherche de biomarqueurs n'a encore été initiée. Or le polymorphisme de méthylation de l'ADN chez les plantes est une source possible de marqueurs pour caractériser des stades de développement, sélectionner des plantes selon des caractères agronomiques ou identifier des génotypes.

La stratégie utilisée pour étudier l'impact des paramètres épigénétiques sur un processus physiologique a été de modifier, par le biais de divers traitements, leurs niveaux dans les cellules traitées (Yoshida *et al.*, 1987 ; Pfeifer *et al.*, 1989 ; Galaud *et al.*, 1993 ; Ruiz-Herrera, 1994 ; Lambé *et al.*, 1997 ; Finnegan *et al.*, 1998). Ces différents traitements se sont avérés très efficaces pour modifier la méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones dans nos lignées cellulaires. Cela a permis d'obtenir toute une collection de lignées cellulaires avec

des niveaux de paramètres épigénétiques très variés. De manière intéressante, ces modifications ont entraîné des variations importantes du phénotype des cultures traitées et cinq phénotypes distincts ont été obtenus : (1) une perte d'organogenèse chez O ; (2) une apparition de dédifférenciation cellulaire dans les cultures de O et NO ; (3) un blanchiment des cellules de DD ; (4) une apparition de cellules redifférenciées dans les cultures de DD et (5) une nécrose cellulaire dans certains cas. Ces modifications phénotypiques sont des manifestations de la plasticité développementale des plantes et ont déjà été décrites dans des plantes traitées de cette manière. Néanmoins, en général, une seule modification phénotypique était décrite suite à un seul traitement effectué sur un seul type de matériel cellulaire (LoSchiavo *et al.*, 1989 ; Burn *et al.*, 1993 ; Galaud *et al.*, 1993 ; Finnegan *et al.*, 1998 ; Fraga *et al.*, 2002). De plus, la combinaison de traitements (dé)méthylants et hyperacétylants n'a jamais été décrite chez les plantes à notre connaissance. Il faut également noter que les niveaux des paramètres épigénétiques étaient clairement distincts chez les lignées non traitées. La lignée organogène O est caractérisée par de faibles teneurs en méthylcytosine et un fort ratio d'acétylation des histones et pourtant de fortes activités enzymatiques (et protéines correspondantes) de la DNMT et HDAC ont été mesurées. Une hypothèse serait que l'organogenèse nécessite un remodelage permanent de la chromatine chez cette lignée justifiant de fortes activités enzymatiques et ceci sans corrélation quantitative avec les niveaux de méthylcytosine et d'histones acétylés. Au contraire, la lignée dédifférenciée DD est caractérisée par de fortes teneurs en méthylcytosine et un faible ratio d'acétylation des histones en accord avec les activités de la DNMT et HDAC. La lignée NO présente des caractéristiques intermédiaires. Une telle relation négative entre le niveau de méthylation de l'ADN et les propriétés morphogénétiques a déjà été rapportée chez diverses plantes (LoSchiavo *et al.*, 1989 ; Galaud *et al.*, 1993 ; Lambé *et al.*, 1997 ; Von Aderkas et Bonga, 2000 ; Fraga *et al.*, 2002). Des travaux récents ont démontré l'existence d'interactions entre la DNMT et l'HDAC (Fuks *et al.*, 2000 ; Rountree *et al.*, 2000 ; Tatematsu *et al.*, 2000). De plus, il a été montré que les séquences méthylées assurent la fixation de certaines protéines qui permettent le recrutement de l'HDAC (Wade *et al.*, 1999 ; Ballestar et Wolffe, 2001 ; Watanabe *et al.*, 2003). Chez les plantes, de telles interactions doivent également exister puisque toutes ces protéines sont conservées (Li *et al.*, 2002 ; Shen, 2002). De tels complexes multiprotéiques seraient alors capables de perpétuer un état inactif au niveau des régions fortement méthylées et faiblement acétylées comme c'est le cas chez la lignée DD. Une telle extinction génique pourrait expliquer les perturbations métaboliques présentes chez la lignée DD.

Comme de nombreux changements phénotypiques ont été obtenus, il fallait les caractériser plus en détail. La différenciation cellulaire ayant déjà été étudiée (Causevic, 2005 ; Causevic *et al.*, 2005), nous avons porté notre attention sur l'état redox de la cellule. Les FAO et l'état redox de la cellule jouent un rôle lors de la différenciation cellulaire (Boonstra et Post, 2004). Dans la collection de lignées cellulaires traitées, l'état redox de la cellule et les systèmes antioxydants ont non seulement été corrélés avec l'état de différenciation des lignées cellulaires mais également avec leurs niveaux de méthylation de l'ADN et d'acétylation des histones et ceci après 14 ou 21 jours de traitement. Il faut également noter que ces corrélations ont été établies sur une courte période de traitement alors qu'elles ont déjà été discutées pour de longues périodes de culture *in vitro* (Lambé *et al.*, 1997 ; Kaepler *et al.*, 2000 ; Von Aderkas et Bonga, 2000 ; Hasler *et al.*, 2003 ; Vanyushin *et al.*, 2004). En effet, lors de ce phénomène des variations de l'état redox sont suivies par des modifications épigénétiques (Joyce *et al.*, 2003).

Ainsi, nous avons pu démontrer l'existence d'un contrôle épigénétique de la morphogenèse *in vitro* sur des lignées cellulaires de betterave sucrière. Puis nous avons réalisé l'identification des loci cibles du remaniement de l'état de méthylation de l'ADN s'opérant entre différents états de différenciation cellulaire. Les loci identifiés sont majoritairement associés à des îlots CpG et présentent des homologies avec des protéines de fonctions variées. La caractérisation de leur profil de méthylation par la technique de séquençage au bisulfite a montré que certains étaient hyper-méthylés. Une approche complémentaire dite "gène candidat" a également permis de corréler un polymorphisme de méthylation avec une activité enzymatique intervenant dans l'état d'oxydoréduction de la cellule et consécutivement avec son état de différenciation.

Deux études récentes se sont intéressées aux liens entre méthylation de l'ADN et morphogenèse *in vitro* (Berdasco *et al.*, 2008 ; Zhao *et al.*, 2008). Zao *et al.* (2008) proposent que les remaniements de la méthylation de l'ADN et la plasticité de la chromatine expliquent en partie l'acquisition de la pluripotentialité dans divers systèmes de régénération *in vitro* (Figure 44). Ce phénomène serait induit et contrôlé par divers stimuli externes ou internes comme les phytohormones. Ces changements de chromatine permettraient alors de réguler divers gènes impliqués dans l'organogenèse (Figure 44). Berdasco *et al.* (2008) ont montré, par l'utilisation de différents mutants d'ADN méthyltransférases et la recherche des loci correspondants, que le maintien de l'état indifférencié et le potentiel de régénération *in vitro*

chez *Arabidopsis* étaient régulés en partie par la méthylation du promoteur de certains gènes (Figure 45).

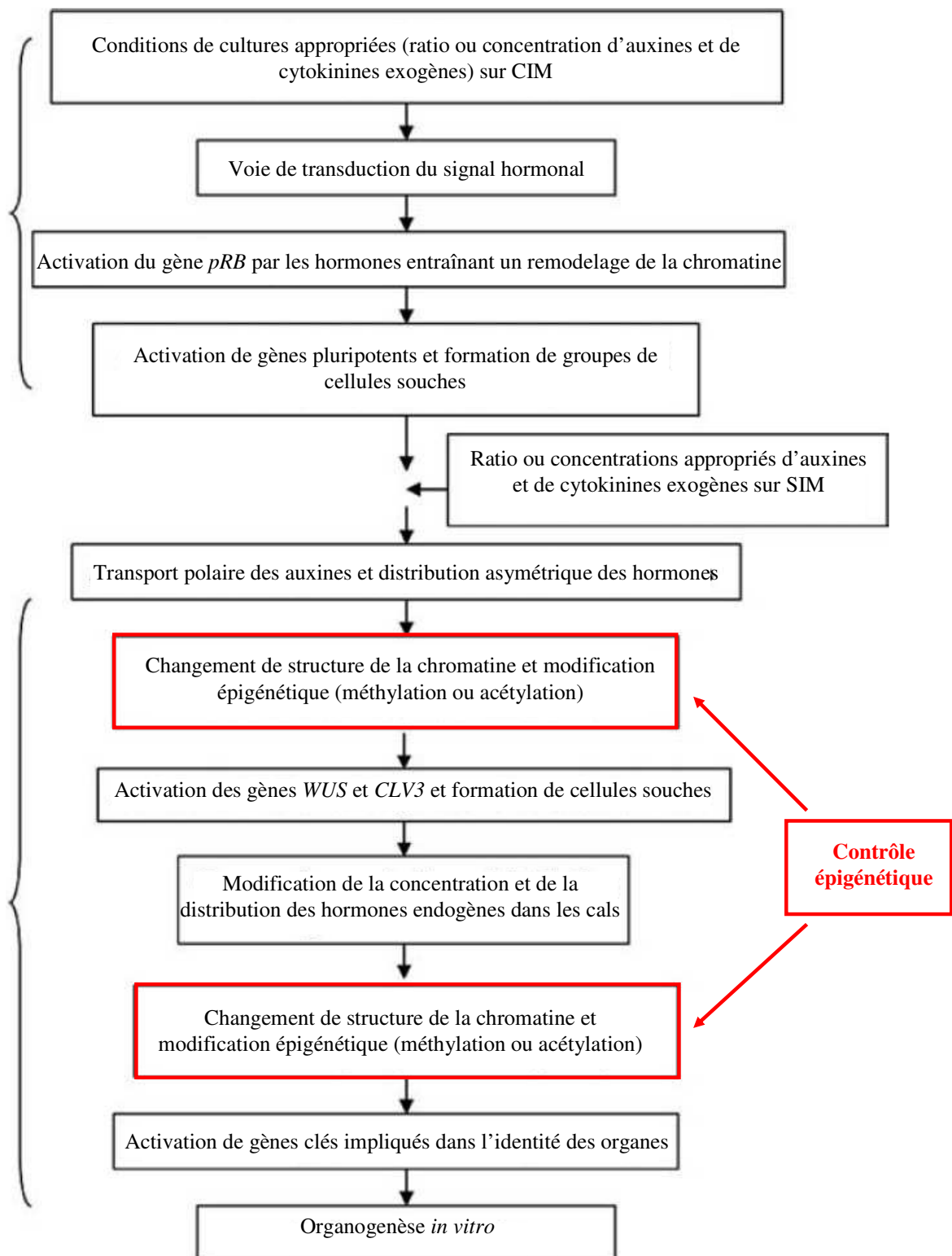
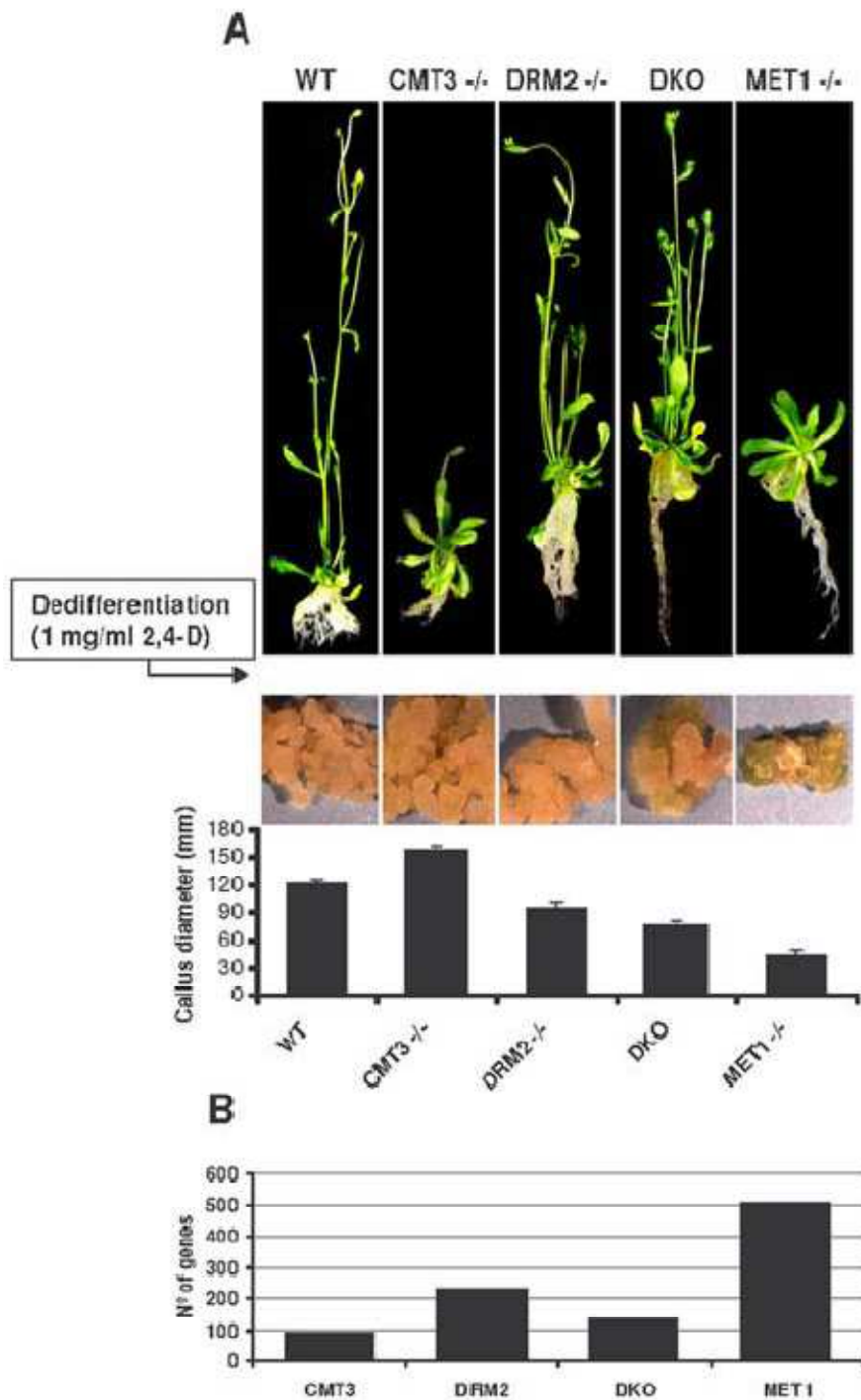


Figure 44. Conditions pour la dédifférenciation et la redifférenciation chez les plantes (d'après Zhao *et al.*, 2008).



**Figure 45.** L'hyperméthylation des promoteurs de gènes dépend de l'activité ADN méthyltransférase de MET1 et DRM2 chez des cals d'*Arabidopsis*. A). En haut, aspects morphologiques des plantes entières obtenues à partir de graines de génotype sauvage ou mutant pour une ou plusieurs ADN méthyltransférase(s). Au milieu, cals obtenus à partir d'*Arabidopsis* de type sauvage ou mutant pour une ou plusieurs ADN méthyltransférase(s). En bas, taux de croissance des cals type sauvage ou mutant pour une ou plusieurs ADN méthyltransférase(s), générés après un traitement avec du 2,4-D sur des explants racinaires. B) Nombre de gènes candidats susceptibles d'être régulés par la méthylation de l'ADN obtenue pour chaque mutant d'une ou de plusieurs ADN méthyltransférase(s). WT, génotype sauvage ; CMT3, mutant pour la chromométhyltransférase 3 ; DRM2, mutant pour la "Domains Rearranged Methyltransferase 2" ; MET1 mutant pour la méthyltransférase 1. (d'après Berdasco *et al.*, 2008).

Les perspectives de ce travail sont maintenant de terminer le criblage de nos biomarqueurs et de caractériser leurs rôles biologiques. Ce travail fera l'objet d'un projet de publication intitulée «Characterization of morphogenesis epigenetic biomarkers in sugar beet lines » (**projet de publication n°3**). Ce travail est déjà en phase de valorisation puisqu'une collaboration a été initiée à ce sujet avec la société semencière SES-VanderHave dans le cadre d'un contrat de recherche (**convention 222N**) et d'un stage prolongé de Master 2 de Mlle Carole Latruwe (Mars 2008-janvier 2009). SESVanderHave est un sélectionneur depuis plus de 125 ans (<http://ses.gx.nl/show?id=7895&langid=3624&mode=edit>). C'est une société exclusivement dédiée à la recherche, la production et la commercialisation de semences de betterave sucrière. SES-VanderHave est déjà un leader dans plusieurs pays européens et ambitionne de devenir le leader mondial de la semence de betterave, grâce à sa génétique de très haut niveau, ses investissements et ses innovations. La validation pour certains marqueurs de leur potentiel de biomarqueur de la morphogenèse végétative sera effectuée sur plusieurs systèmes expérimentaux de morphogenèse chez la betterave sucrière. Le premier correspond à l'étude de la vigueur germinative de semences, le deuxième s'intéresse au potentiel de régénération de plants entiers à partir de cals en vue d'une possible transgenèse et le dernier porte sur la formation *in vitro* de racines à partir de cals. Le matériel végétal a été fourni par le centre de recherche de la société SESVanderHave situé à Tienen en Belgique (Bert Vandebussche, Guy Weyens, Steve Barnes et Marc Lefebvre) à l'exception des cals avec formation de racines qui ont été produits au LBLGC d'Orléans (Alain Delaunay, Claude Joseph et Stéphane Maury).

Tous ces résultats ont été établis sur des lignées cellulaires cultivées *in vitro*. Il était important de valider ces données sur la plante entière. En fait, cette transposition n'était pas si difficile puisque la morphogenèse chez les plantes a lieu au niveau de zones définies appelées méristèmes. L'une des modifications les plus importantes du méristème est la transition florale qui dépend de paramètres environnementaux comme la lumière et la température et qui est accompagnée d'un changement des capacités de morphogenèse. Les mécanismes impliqués sont variés et complexes. Cependant, un contrôle épigénétique a été démontré chez la plante modèle *Arabidopsis*. En effet, l'effet du froid permettant l'acquisition ou l'accélération de l'aptitude à fleurir (ou vernalisation) implique une hypométhylation de l'ADN (Holliday, 1990 ; Burn *et al.*, 1993 ; Finnegan *et al.*, 1996 ; Ronemus *et al.*, 1996 ; Finnegan *et al.*, 1998 ; Sheldon *et al.*, 2000 ; Sung et Amasino, 2004).

Cependant tous ces mécanismes ont été étudiés chez *Arabidopsis* qui est une plante modèle annuelle. Notre objectif était de tester ces connaissances sur notre plante d'étude bisannuelle : la betterave sucrière qui présente un besoin en vernalisation génotype-dépendant et un réel intérêt agro-économique. En effet, cette plante est cultivée sur plus de 2 millions d'hectares dans le monde et génère 75 millions de dollars par an de ressources financières. C'est dans ce contexte que mon projet de thèse (cofinancée Région-Entreprise) s'est rapidement orienté en collaboration avec la société semencière SES-VanderHave (initialement ADVANTA, Belgique) et le Conseil Régional de la Région Centre. Ce contexte, les objectifs ainsi que les résultats sont présentés dans les chapitres 2 et 3.





# Chapitre 2

Mise en évidence d'un contrôle  
épigénétique de la vernalisation et de la  
dévernalisation chez la betterave sucrière

---



# Chapitre 2

## Mise en évidence d'un contrôle épigénétique de la vernalisation et de la dévernalisation chez la betterave sucrière

---

### Introduction

1. La vernalisation : état de l'art
2. Mise en évidence d'un contrôle épigénétique de la vernalisation, de la dévernalisation et de variations génétiques chez des hybrides de betterave sucrière (**Contrat de recherche 044N avec SES-VanderHave et CPR n°04.08.22 Biotechnocentre avec le Conseil Régional de la Région Centre et publication n°4**)
3. Résultats complémentaires

Conclusions et perspectives (**Contrat de recherche 044N et bourse CIFRE**)



## Introduction

Dans le 1<sup>er</sup> chapitre nous avons présenté, la stratégie mise au point pour la recherche de biomarqueurs épigénétiques et son application pour la mise en évidence d'un contrôle épigénétique dans la morphogenèse *in vitro* chez la betterave sucrière. Nous avons ensuite appliqué cette stratégie sur un système biologique *in planta*. L'objectif de nos travaux était de démontrer l'existence d'un contrôle épigénétique lors de la vernalisation et de la dévernalisation chez la betterave sucrière.

Ce chapitre se compose de trois parties. La première est constituée d'une synthèse bibliographique sur la vernalisation. La 2<sup>ème</sup> partie présente nos résultats sous la forme d'une publication intitulée «Kinetics and genetic variations of epigenetic marks in vernalized or devernalized sugar beet hybrids with distinct bolting sensitivities» (**Trap-Gentil et al., en preparation ; publication n°4**). La dernière partie apportera quelques compléments à l'article.



**Figure 46.** Variété de choux bisannuelle (*Brassica oleracea*) avec un besoin absolu en vernalisation et cultivé cinq années sans jamais avoir été exposé au froid : aucune floraison n'est observée (à gauche). La fille du Dr. Amasino porte une variété annuelle de la même espèce, qui a fleuri rapidement sans vernalisation (Amasino, 2004).

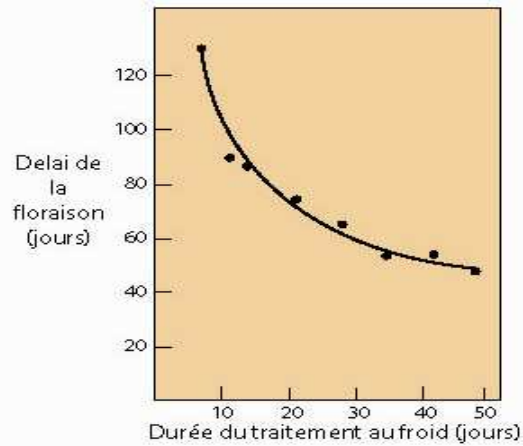
## 1. La vernalisation : état de l'art

### 1.1. Définition

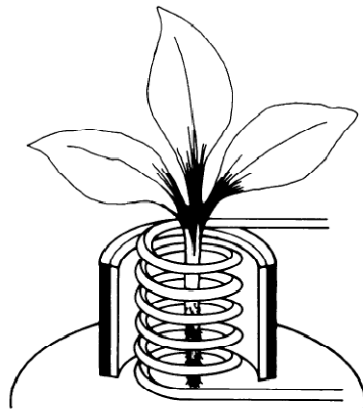
Chez les plantes la floraison est un moment critique de leur cycle de vie. Ces dernières grâce aux informations environnementales telles que la photopériode et la température peuvent déterminer le moment le plus propice pour fleurir. La température est, en effet, un paramètre fluctuant de l'environnement en fonction de la latitude, de l'altitude, de la présence de mer ou d'océan mais également au cours des alternances jour/nuit et des saisons. Cette variabilité est à la fois un facteur de répartition des espèces végétales mais également un facteur qui rythme la vie des végétaux. La température et la lumière sont donc les signaux régulateurs majeurs de l'horloge circadienne et des indicateurs saisonniers.

Certaines plantes des régions tempérées requièrent une période de froid hivernal, on parle de **vernalisation**, pour acquérir ou accélérer leur aptitude à fleurir et donc à se reproduire (Chouard, 1960). Ces plantes sont des annuelles d'hiver comme le blé (*Triticum sativum*), l'orge (*Hordeum vulgare*) et le seigle (*Secale cereale*) ou des bisannuelles comme la betterave (*Beta vulgaris*), la carotte (*Daucus sp*) et la jusquiame (*Hyosciamus niger*). Toutefois, parmi les écotypes d'une même espèce le besoin en vernalisation peut être absolu, relatif ou nul (Figure 46). Contrairement à l'acclimatation au froid qui s'opère au bout de quelques jours (Thomashow, 2001), la vernalisation nécessite, pour être efficace, plusieurs semaines d'exposition au froid à des températures généralement comprises entre +1°C et +7°C (Purvis et Gregory, 1952 ; Thomashow, 1999), ou voire au-delà comme chez l'olivier (+13°C). C'est pourquoi, des mécanismes différents seraient impliqués lors de ces processus d'acclimatation au froid et de vernalisation. Cette dernière agit aux faibles températures mais jamais au cours de gelées car elle requiert une activité métabolique.

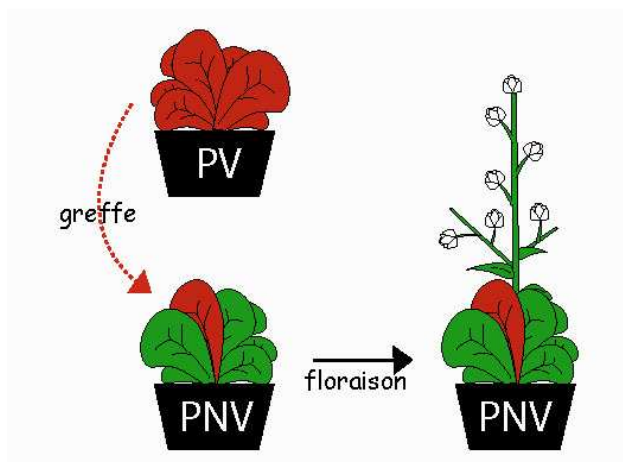




**Figure 47.** Le délai de floraison diminue proportionnellement à l'augmentation de la durée d'exposition au froid chez l'espèce *Secale cereale*.



**Figure 48.** Schéma du dispositif utilisé pour maintenir de manière sélective une tige à une température différente du reste de la plante (Metzger, 1988).



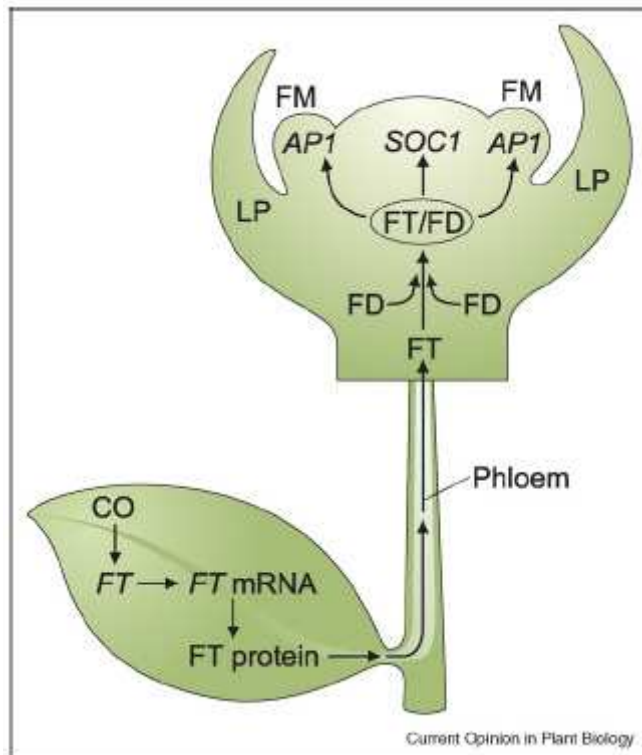
**Figure 49.** Schéma original de l'auteur représentant la mise en évidence d'un stimulus de vernalisation diffusible par greffe par Thomas et Vince-Prue (1984). Des greffes ont été réalisées entre des greffons issus de plantes (*Beta vulgaris*) vernalisées (PV) sur des porte-greffes qui n'étaient pas vernalisés (PNV). De telles greffes ont provoqué la floraison des plantes.

## 1.2. Caractéristiques de la vernalisation

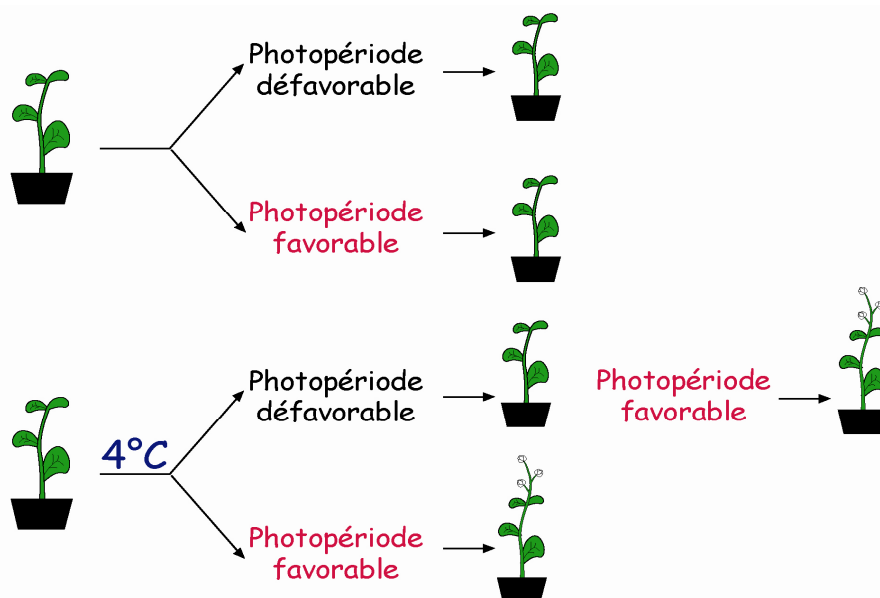
Le nombre de jours requis pour fleurir diminue parallèlement à l'augmentation de la durée d'exposition au froid (Figure 47 ; Purvis et Gregory, 1937 ; Sheldon *et al.*, 2000a). Les plantes peuvent répondre à la vernalisation à différents stades de développement. Par exemple, *Triticum sativum* (annuelle) peut être vernalisé à l'état de semence imbibée alors que *Beta vulgaris* (bisannuelle) ne peut l'être qu'au stade de rosette. On parle de phase juvénile, au cours de laquelle la plante ne peut pas être vernalisée et de maturité de vernalisation, au cours de laquelle les plantes peuvent être vernalisées. Enfin, ce processus est réversible suite à un traitement de quelques jours à des températures comprises entre 25 et 35°C, on parle alors de **dévernalisation** (Purvis et Gregory, 1952).

## 1.3. Sites de perception et nature du signal de la vernalisation

Des expériences impliquant des traitements vernalisants localisés sur différentes parties de la plante montrent que le méristème apical caulinaire est le site de perception du froid vernalisant chez la plupart des plantes (Figure 48 ; Schwabe, 1954 ; Metzger, 1988). Cependant, cette perception peut être également localisée au niveau des racines (Joseph *et al.*, 1982). Comme l'état de vernalisation est un phénomène induit, des chercheurs se sont interrogés sur la nature du signal et sa transmission. Afin de mettre en évidence l'existence d'un tel signal, Thomas et Vince-Prue (1984) ont réalisé des greffes entre différents plants de *Beta vulgaris* (Figure 49). Les greffons étaient issus de plantes vernalisées alors que les porte-greffes n'étaient pas vernalisés. De telles greffes provoquaient la floraison des plantes. Ces expériences ont suggéré l'existence d'un stimulus de vernalisation diffusible par greffe et donc certainement par la sève, appelé vernaline. Les tentatives d'isolement et d'identification de ce composé sont restées longtemps infructueuses, mais de récents progrès dans la compréhension de la voie de régulation de la floraison chez *Arabidopsis* montrent qu'en jours longs, une protéine appelée CONSTANS (CO) s'accumule dans la feuille et induit ainsi l'expression que du gène *FLOWERING LOCUS T (FT)* au niveau des cellules compagnes du phloème (Figure 50). La protéine FT serait le signal inducteur de la floraison qui migrerait d'une feuille "induite" et circulerait par le phloème jusqu'à l'apex caulinaire (Turck *et al.*, 2008, Zeevaart, 2008).



**Figure 50.** La protéine FT un signal transmissible induisant la floraison. En jours longs, la protéine CO s'accumule dans les feuilles et induit l'expression de FT au niveau des cellules compagnes du phloème. La protéine FT est ensuite transportée par la sève jusqu'à l'apex caulin, où elle forme un hétérodimère avec la protéine FD. Le complexe protéique FD/FT active l'expression des protéines SOC1 et AP1, lesquelles induisent l'initiation florale. FM, méristème floral ; LP, primordium foliaire (Zeevaart, 2008).



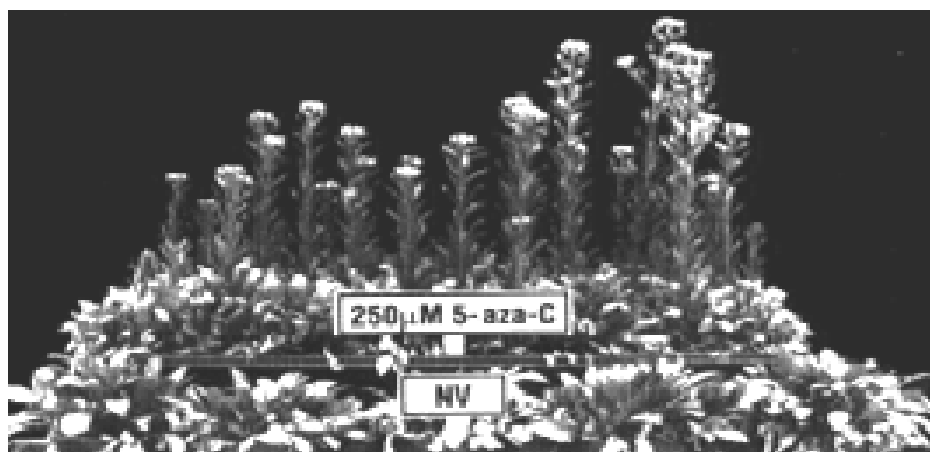
**Figure 51.** Schéma original de l'auteur représentant la mise en évidence d'une mémoire de la vernalisation par Lang (1965). Des plantes vernalisées placées en photopériode défavorable ne fleurissent pas, mais si elles sont placées après un certain temps en photopériode favorable, elles fleurissent.

De ce fait, même si FT n'est pas le seul, cette protéine serait un des composants du florigène (Turck et al., 2008 ; Zeevaart, 2008). En outre, FT n'est pas uniquement produite par la voie de la photopériode mais peut l'être également par la voie autonome et la voie de la vernalisation.

Une autre hypothèse concernant cette fois un signal hormonal de type gibbérelline a également alimenté de nombreuses controverses. En effet, selon les espèces, l'application de gibbérellines sur des plantes non vernalisées provoque soit une floraison, soit une montaison sans floraison (élongation des entre-nœuds), soit n'a aucun effet. Par exemple, l'application de gibbérellines entraîne la floraison de la jusquiame et de la carotte bisannuelle, la montaison de la betterave (Lang, 1957) et n'a aucun effet sur les céréales. Mutasa-Gottgens *et al.* (2009) montrent qu'un gène codant une enzyme nécessaire pour la synthèse des gibbérellines est activé lors de la vernalisation. L'inhibition de ce gène induirait un retard de la montaison (Mutasa-Gottgens *et al.*, 2009). Toutefois, les gibbérellines joueraient plutôt un rôle lors de la transition florale.

#### 1.4. Mémoire de la vernalisation et contrôle épigénétique chez la plante modèle *Arabidopsis*

Un autre mécanisme a été envisagé pour la vernalisation. Dès 1964, Wellensiek montre qu'une activité de division cellulaire au sein du méristème est nécessaire durant la vernalisation pour la mise en place des futures pièces florales et que *in vitro* seuls des tissus contenant des cellules en division peuvent régénérer des plantes vernalisées. De plus, des plantes vernalisées placées en photopériode défavorable ne fleurissent pas, mais placées après un certain temps en photopériode favorable, elles fleurissent. Cela démontre l'existence d'une mémoire de la vernalisation au niveau du méristème (Figure 51). Chez *Hyoscyamus niger* cette mémoire peut être maintenue plus de 330 jours (Lang, 1965). La "mémoire" de la vernalisation se transmet aux cellules filles (mitotiquement stable) (Holliday, 1990) mais non à la descendance (génétiquement non héritable) (Metzger, 1988). De tels résultats démontrent l'implication d'un contrôle épigénétique, phénomène qui se propage grâce aux divisions cellulaires successives et qui induit un changement de phénotype sans modification du génotype (Waddington, 1957).



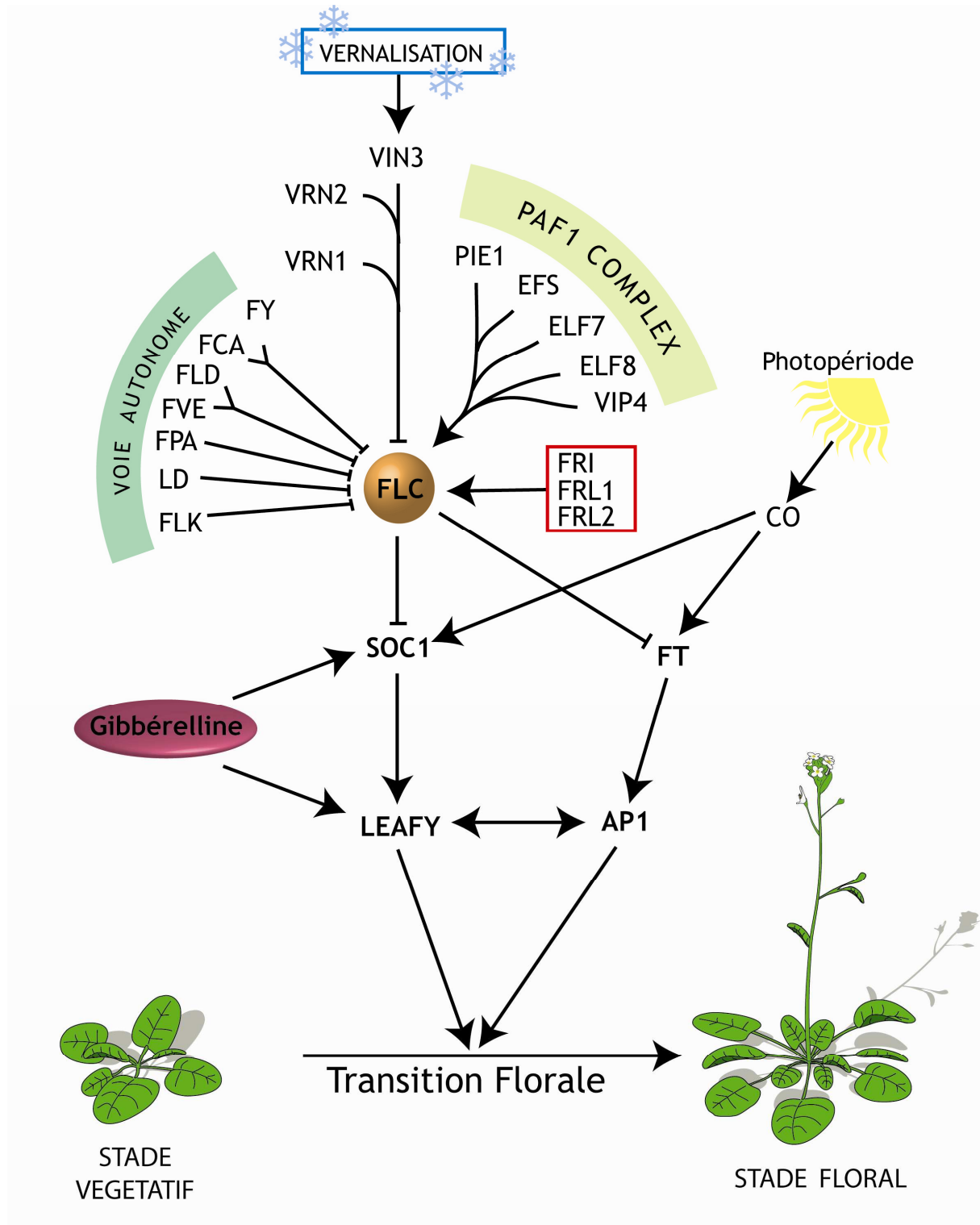
**Figure 52.** Photographie de plantes témoin (*Arabidopsis*) non vernalisées (NV) et de plantes non vernalisées traitées par de la 5-azacytidine. L'application de cet agent hypométhylant de l'ADN à induit la floraison précoce de ces plantes (Burn *et al.*, 1993).

En conséquence, plusieurs problèmes se posent :

- comment la plante peut-elle “mesurer” la durée d'application du froid ?
- comment la plante conserve-t-elle la mémoire du froid ?
- s'ils existent, quels sont les mécanismes épigénétiques impliqués et comment induisent-ils la floraison ?

Afin de mettre en évidence un éventuel rôle de la méthylation de l'ADN lors de la vernalisation, Burn *et al* (1993) ont traité des plants d'*Arabidopsis* avec un agent hypométhylant de l'ADN : la 5-azacytidine. Cet analogue de la cytidine peut s'incorporer à l'ADN lors de sa réplication, mais interdit toute méthylation en raison de la substitution d'un atome de carbone par un atome d'azote en position 5 du cycle pyrimidine. Un tel traitement induit une hypométhylation progressive de l'ADN après plusieurs cycles successifs de réplication et donc de divisions cellulaires. Ainsi, chez des écotypes non vernalisés d'*Arabidopsis*, de blé et de lin, l'application d'un traitement hypométhylant de l'ADN induit une floraison précoce chez des plantes (Figure 51 ; Burn *et al.*, 1993 ; Brock et Davidson, 1994 ; Fieldes *et al.*, 2005). Ces expériences montrent que chez ces espèces, une hypométhylation de l'ADN suffit à provoquer la floraison. Burn *et al.* (1993) ont également démontré l'effet hypométhylant naturel d'une période de froid sur l'ADN. En effet, les méthyltransférases de maintenance seraient sensibles au froid, ce qui empêcherait la méthylation des nouveaux brins d'ADN synthétisés (Bird, 1978).

L'étude de mutants et de plantes transgéniques, chez lesquels il y a inhibition de l'expression du gène codant l'ADN méthyltransférase MET1, confirme qu'une hypométhylation de l'ADN accélère la floraison chez *Arabidopsis* (Ronemus *et al.*, 1996 ; Finnegan *et al.*, 1998). Plus l'hypométhylation est importante et plus la floraison est précoce (Finnegan *et al.*, 1998). Cette déméthylation permet l'activation de la transcription de certains loci, entraînant de manière directe ou indirecte l'induction de la floraison. La vernalisation affecterait préférentiellement les séquences importantes pour la levée de l'inhibition de la floraison contrairement aux autres traitements qui ont une action plus globale. Par ailleurs, les loci cibles de la vernalisation seraient protégés d'une nouvelle méthylation après retour à des températures plus élevées. Cependant, des écotypes mutants d'*Arabidopsis* présentant constitutivement de faibles taux de méthylation montrent également une faible réponse à la vernalisation et fleurissent plus tardivement que des écotypes témoins avec un taux normal de méthylation (Kakutani, 1997 ; Genger *et al.*, 2003 ; Finnegan *et al.*, 2005).



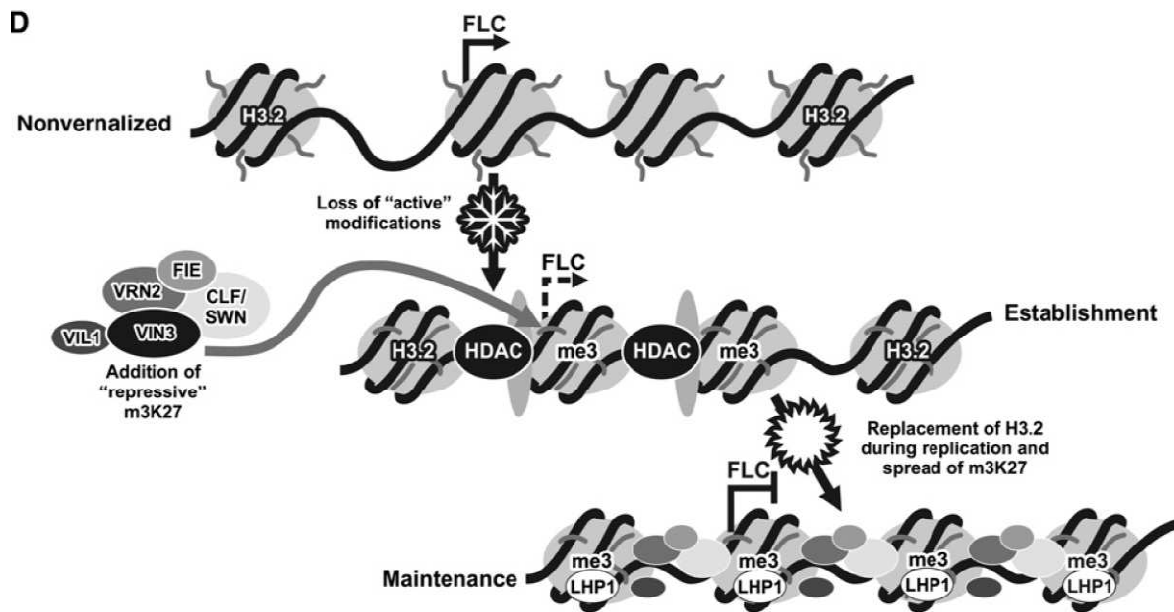
**Figure 53.** Schéma représentant la régulation complexe du gène FLC par plusieurs voies stimulatrices et inhibitrices. AP1, APETELLA 1 ; CO, CONSTANS ; ELF7, EARLY FLOWERING 7 ; ELF8, EARLY FLOWERING 8 ; FCA, FCA protein; FLC, FLOWERING LOCUS C ; FLD, FLOWERING LOCUS D ; FLK, FLOWERING LATE KH DOMAIN ; FPA, FLORAL PROMOTER AUTONOMOUS PATHWAY; FRI, FRIGIDA; FRL1, FRIGIDA-LIKE; FRL2, FRIGIDA-LIKE2; FT, FLOWERING TIME T; FVE, FVE protein ; FY, FY protein ; LD, LUMINIDEPENDENS ; LFY, LEAFY ; PIE1, PHOTOPERIOD INDEPENDENT EARLY FLOWERING1 ; SOC1, SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 ; VIN3, VERNALIZATION INSENSITIVE 3 ; VIP4, VERNALIZATION INDEPENDENCE 4 ; VRN1, VERNALIZATION1 ; VRN2, VERNALIZATION 2 (figure originale de l'auteur).

Ces résultats, créent une certaine confusion quant au rôle de la méthylation de l'ADN dans la réponse à la vernalisation. De plus, contrairement au phénotype “vernalisé”, le profil de méthylation de l'ADN est transmissible à la descendance, ce qui suggère l'intervention d'autres mécanismes épigénétiques au cours de la vernalisation (Fieldes *et al.*, 2005 ; Finnegan *et al.*, 1996). Ainsi, le phénotype “ vernalisation ” pourrait être effacé dans la descendance grâce à une méthylation *de novo* au cours de la gamétogenèse ou du développement embryonnaire (Finnegan *et al.*, 1998).

#### 1.4. Gènes cibles du contrôle épigénétique chez *Arabidopsis*

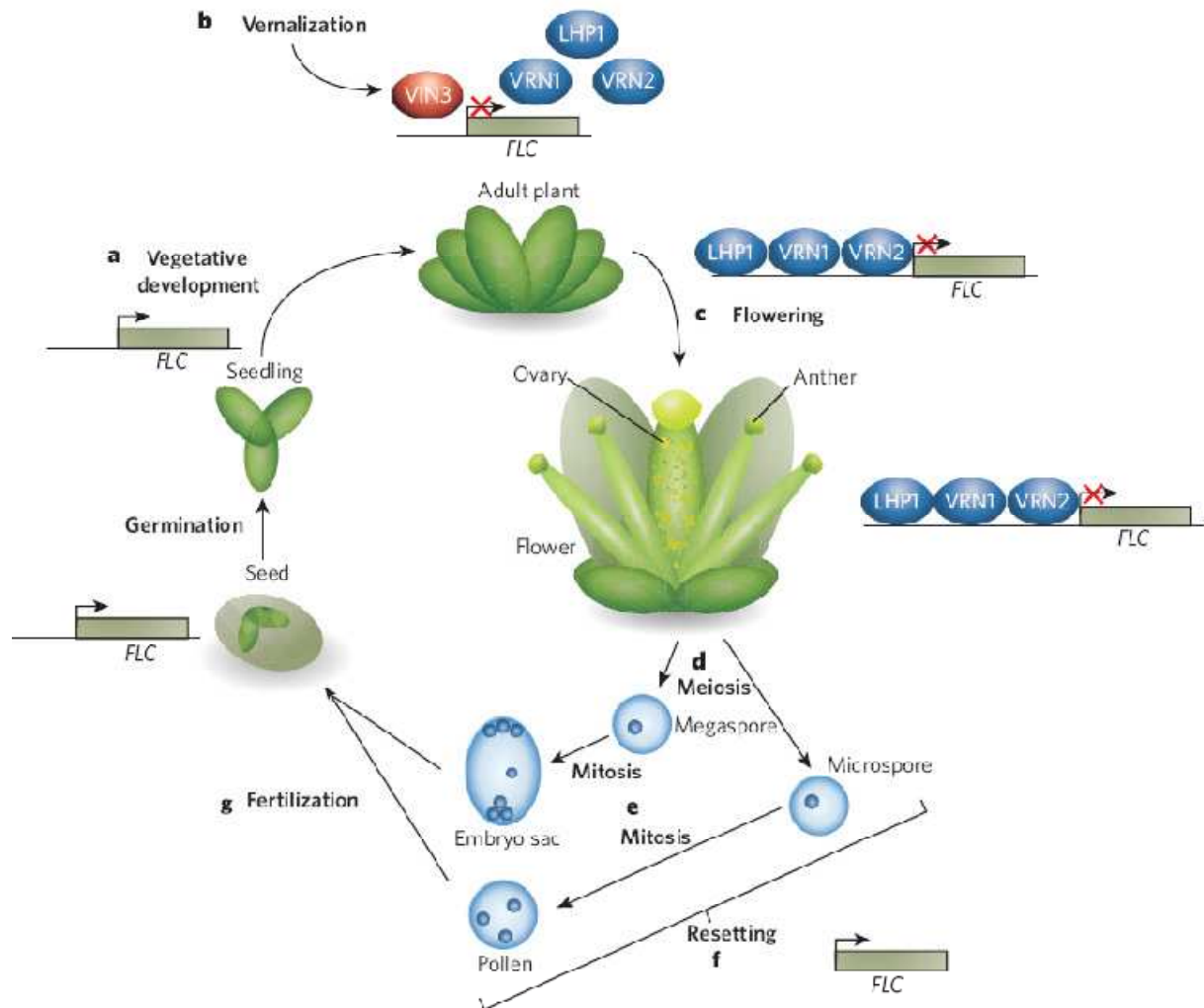
Divers travaux, focalisés sur la recherche des loci cibles du contrôle épigénétique ont également été entrepris. Deux loci dominants inhibiteurs de la floraison appelés *FLOWERING LOCUS C (FLC)* et *FRIGIDA (FRI)* ont été identifiés chez *Arabidopsis* (Sheldon *et al.*, 2000b). L'initiation de la floraison par la vernalisation est due à l'inhibition de *FLC* (Michaels et Amasino 1999 ; Johanson *et al.*, 2000). En effet, *FLC* réprime de manière constitutive l'expression de plusieurs gènes dans le méristème apical caulinaire et notamment de *FT* dans les feuilles (Searle *et al.*, 2006). Ainsi la répression du gène *FLC* permettra l'expression de *FT*, le ou un des composants du signal de “floraison”. *FLC* est un facteur de transcription de type MADS-box qui s'exprime principalement dans les tissus présentant des divisions mitotiques actives telles que les méristèmes caulinaires et racinaires, lesquels sont les sites de perception de la vernalisation. De plus, de récentes études ont permis de montrer que *FLC* est la cible d'une régulation complexe (en partie épigénétique), faisant intervenir plusieurs voies distinctes stimulatrices comme la voie du complexe PAF1, par la voie *FRI* et inhibitrices comme la voie autonome, la voie de vernalisation (Figure 53 ; Sheldon *et al.*, 2000b ; Sung et Amasino, 2004a ; Searle *et al.*, 2006). Ainsi, la voie du complexe PAF1 et le gène *FRI* stimulent l'expression de *FLC*, ce qui empêche la floraison. Au contraire, la voie autonome inhibe le gène *FLC* et permet la levée de l'inhibition de la floraison chez les plantes ne nécessitant pas de traitement vernalisant.





**Figure 54.** Modifications de la chromatine au cours de la vernalisation au niveau du locus *FLC*. Chez les plantes non vernalisées, les histones de *FLC* sont acétylées et triméthylées au niveau des lysines 4 des histones H3 et H4 (indiqué par les queues N-terminale dépassant du corps des histones). Le promoteur et les régions codantes de *FLC* sont riches en variant histone H3.2. Durant l'exposition au froid, la protéine VIN3 induit une désacétylation des histones ainsi que la déméthylation des lysines 4 (queues N-terminale proche de l'ADN), ce qui réprime l'expression de *FLC*. VIN3 recrute le complexe protéique PRC2 ; cet ensemble induit une triméthylation des lysines 27 (me3) au début du gène. De retour à des températures plus élevées, la réplication de l'ADN permet le remplacement au niveau de l'ensemble du locus *FLC* des variants histones H3.2 par les variants H3.1, lesquels seront consécutivement triméthylés au niveau des lysines 27. Les composants du complexe PRC2 (excepté VIN3, lequel n'est pas exprimé longtemps) et LHP1 restent associés à la chromatine de *FLC* et permettent une inactivation stable de ce locus (Finnegan et Dennis, 2007).

La vernalisation agit indépendamment de la voie autonome et inhibe l'expression de *FLC* en changeant la structure de sa chromatine, ainsi que celle située à son voisinage et ceci de manière mitotiquement stable. Cependant, l'expression de *FLC* est restaurée à chaque génération (Michaels et Amasino, 2001 ; Henderson et Jacobsen, 2007). En outre, après une longue période de froid, le gène *VERNALIZATION INSENSITIVE3 (VIN3)* s'exprime (Figure 47). Il code une protéine 'PLANT-HOMEODOMAIN-finger' qui intervient dans le remodelage de la chromatine (Aasland *et al.*, 1995). *VIN3* provoque la désacétylation des histones H3 du locus *FLC* induisant ainsi une inhibition de son expression (Figure 54 ; Bastow *et al.*, 2004b ; Sung et Amasino, 2004 ; Finnegan et Dennis, 2007). Cependant cette répression n'est pas stable puisqu'elle disparaît dès le retour de températures plus élevées. En outre, lors de cette période prolongée de froid, *VIN3* va également recruter un complexe protéique contenant la protéine *VERNALIZATION2 (VRN2)*. Ce complexe protéique va induire une triméthylation des lysines 9 et 27 de l'histone H3 (Bastow *et al.*, 2004 ; Sung et Amasino, 2004). En outre, en absence de divisions cellulaires, la triméthylation des lysines 27 ne pourra être maintenue lors du retour à des températures plus élevées, confirmant le fait que la réplication est essentielle pour la maintenance de l'état vernalisé par *FLC* (Finnegan et Dennis, 2007). C'est l'action ultérieure des protéines *LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN1 (LHP1)*, une histone méthyltransférase et *VERNALIZATION1 (VRN1)* qui en augmentant la méthylation des histones H3 entraîneront une répression stable et irréversible de *FLC* (Gendall *et al.*, 2001 ; Sung et Amasino, 2004b ; Sung *et al.*, 2006 ; Mylne *et al.*, 2006). Ainsi, lors de la vernalisation, plusieurs modifications complexes de nature épigénétique s'enchaînent en cascade au niveau de *FLC* (He *et al.*, 2003 ; Farrona *et al.*, 2008) et la dernière modification permet une inhibition irréversible de son expression (Tableau 8 ; Bastow *et al.*, 2004 ; Sung et Amasino, 2004b ; Sung *et al.*, 2006 ; Mylne *et al.*, 2006). Cette série de modifications successives contribue au mécanisme de "mémoire" de la vernalisation. Dès le retour de conditions environnementales favorables, la répression du gène *FLC* induit la levée de l'inhibition des gènes permettant à la morphogenèse florale. Ces travaux ont permis de comprendre comment la plante perçoit et conserve la mémoire du traitement au froid. Les modifications des histones ne sont pas transmissibles par méiose, ce qui explique qu'à chaque nouvelle génération, les individus doivent être vernalisés (Figure 55).



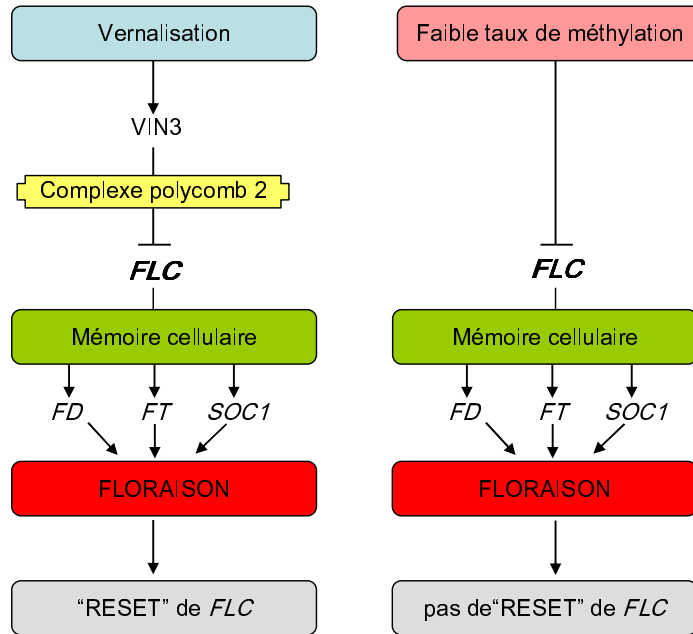
**Figure 55.** Expression du répresseur de floraison *FLC* durant la vie de la plante (*Arabidopsis*). a. *FLC* s'exprime dans la graine et la plantule, prévenant la floraison et maintenant l'état végétatif de la plante. b. la vernalisation induit l'expression de la protéine VIN3 (en rouge) qui initie la répression de *FLC*. VIN3 recrute VRN2, VRN1 et LHP1 (en bleu), qui induisent une triméthylation des lysines 27 des histones H3. c. De retour à des températures plus élevées, la répression de *FLC* est maintenue, permettent ainsi de lever l'inhibition de la floraison. d. Durant, le développement floral, des microspores et des macrospores sont formés par méiose, respectivement au niveau des anthères et des ovaires. e. Les produits de la méiose vont subir des mitoses afin de former respectivement, des grains de pollen et un sac embryonnaire. f. LHP1, VRN1 et VRN2 seront désassociés de *FLC* par un processus inconnu. Ce phénomène de "resetting" permet de nouveau, l'expression de *FLC*. g. La fécondation du sac embryonnaire par un grain de pollen permet la formation d'une graine, dans laquelle *FLC* s'exprime (Henderson et Jacobsen, 2007).

**Tableau 8.** Résumé des modifications des histones observés au niveau de *FLC* (Farrona *et al.*, 2008).

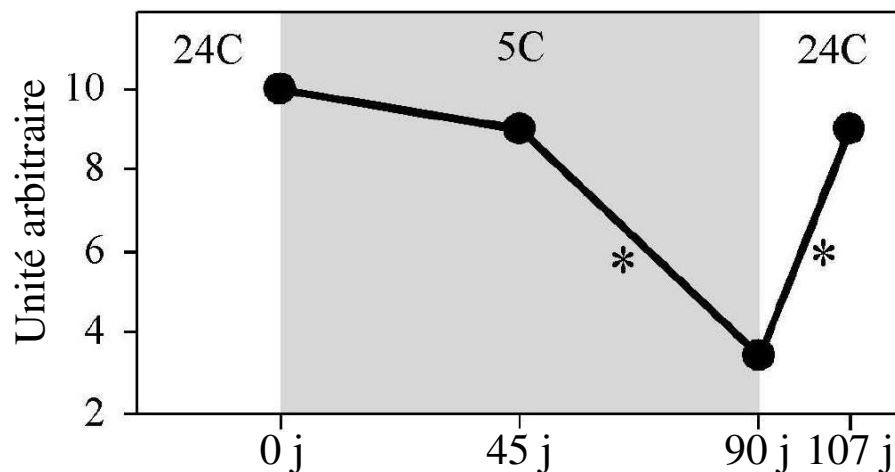
Histone modification	FLC region	Background/ Arabidopsis line	Effect during vernalization	Mutant information
H3K9me2	2, 4	Col FRI	Increase	<i>vin3</i> : no increase, no <i>FLC</i> repression <i>vm1</i> : no increase, no maintenance of <i>FLC</i> repression <i>vm2</i> : as <i>vm1</i>
	6		No change	
	1, 2	<i>Ler fca-1</i> Ler FRI	Increase	<i>vm1</i> : no increase, no increase, no maintenance of <i>FLC</i> repression <i>vm2</i> : as <i>vm1</i>
	7	Col	-	Col: positive <i>td3-2</i> : 50% decrease, high <i>FLC</i> levels
H3K9me3	2, 4	Col FRI	Increase	<i>vin3</i> : no increase, no <i>FLC</i> repression <i>vil1-1</i> : no increase, reduced <i>FLC</i> repression
H3K27me2	2, 4	Col FRI	Increase	<i>vin3</i> : no increase, no <i>FLC</i> repression <i>vm2</i> : no increase, no maintenance of <i>FLC</i> repression <i>vm1</i> : increase, no maintenance of <i>FLC</i> repression
	6		No change	
	2	<i>Ler fca-1</i> Ler FRI	Increase	<i>vm2</i> : no increase, no maintenance of <i>FLC</i> repression <i>vm1</i> : increase, no maintenance of <i>FLC</i> repression
H3K27me3	2, 4	Col FRI	Increase	<i>vin3</i> : no increase; no <i>FLC</i> repression <i>vil1-1</i> : no increase, no <i>FLC</i> repression
	2	Ler FRI	Increase	<i>vin3-6</i> : no increase, delayed <i>FLC</i> repression, no maintenance of <i>FLC</i> repression <i>vil1/vrn5-1</i> : reduced increase, reduced and delayed <i>FLC</i> repression
	1-7	Ler WS?	-	ChIP-chip data
	1, 2	Col FRI	Increase	
	3-7		Spreading after return to warm temperatures	Mature leaves: spreading does not occur, <i>FLC</i> repression is not maintained
H3K9/K14Ac	2, 4	Col FRI	Decrease	<i>vin3</i> : no decrease, no <i>FLC</i> repression <i>vil1-1</i> : as <i>vin3</i> <i>vm1</i> : decrease but not maintained after return to warm temperatures <i>vm2</i> : as <i>vm1</i>
	6		No change	
	1, 2, 4, 5	<i>Ler fca-1</i> Ler FRI	No change	<i>vm1</i> : no change in fragment 2 <i>vm2</i> : no change in fragment 2
	3		Decrease	
	2		Decrease	<i>vin3-6</i> : decrease; delayed repression of <i>FLC</i> <i>vil1/vrn5-1</i> : decrease; reduced repression of <i>FLC</i>
	1-7	Col FRI	Decrease	Decrease not maintained after return to warm temperatures, <i>FLC</i> repression not maintained
	1-7	Ler	-	<i>five</i> : increase, high <i>FLC</i> levels
H4K5/K8/K12/K16Ac	2	Col FRI	Decrease	Mature leaves: decrease not maintained after return to warm temperatures, <i>FLC</i> repression not maintained
	2	Col	-	<i>fid-3</i> : increase, high <i>FLC</i> levels <i>five-4</i> : increase, high <i>FLC</i> levels <i>fca-9</i> : no change, high <i>FLC</i> levels <i>td-1</i> : no change, high <i>FLC</i> levels
H2AZ	1-7	Col, Col FRI	-	Col: peak at transcriptional start and stop <i>arp6-1</i> : no peak, low <i>FLC</i> levels <i>pie1-5</i> : no peak, low <i>FLC</i> levels FRI: as Col, high <i>FLC</i> levels
H3K4me2	1, 2, 4, 5	<i>Ler fca-1</i> Ler FRI	No change	
	3		Decrease	<i>vm1</i> : no decrease <i>vm2</i> : decrease
	3, 4	Col	-	<i>fca-9</i> : increase, high <i>FLC</i> levels <i>fid-3</i> : increase, high <i>FLC</i> levels <i>td3-1</i> : increase, high <i>FLC</i> levels <i>five-3</i> : no change, high <i>FLC</i> levels

Tableau 8. (suite).

Histone modification	FLC region	Background/ Arabidopsis line	Effect during vernalization	Mutant information
H3K4me3	2	Col FRI	Decrease	Mature leaves: increase not maintained after return to warm temperatures, FLC repression not maintained
	2	Col	-	FRI: increase, high FLC levels <i>fld3</i> : increase; high FLC levels
	2	Col FRI	-	FRI: increase, high FLC levels <i>fca-9</i> : increase, high FLC levels <i>efs</i> FRI: no increase, low FLC levels <i>efs fca</i> : no increase, low FLC levels FRI <i>elf7-7</i> : no increase, low FLC levels FRI <i>elf8-1</i> : no increase, low FLC levels
	2	Col	-	<i>ld11 fld</i> : Increase, high FLC <i>ld11 ld2</i> : no change, high FLC levels
	2, 3	Col	-	<i>sdg8-2</i> : no change, low FLC levels <i>sdg26-1</i> : no change, high FLC levels <i>vip4</i> : decrease, low FLC levels
	H3K36me1	2, 3	Col	-
H3K36me2	2, 3	Col	-	<i>sdg8-2</i> : decrease, low FLC levels <i>sdg26-1</i> : no change, high FLC levels <i>vip4</i> : decrease, low FLC levels
	1, 4	Col	-	<i>sdg8-1</i> : decrease, low FLC levels
	2, 3	Col	-	<i>sdg8-1</i> : no change; low FLC levels
H3K36me3	2, 3	Col	-	<i>sdg8 2</i> : decrease, low FLC levels <i>sdg26 1</i> : no change, high FLC levels <i>vip4</i> : decrease, low FLC levels
FCA	5	Col	-	Col and 35S::FCA Chromatin factor binding
FPA	2, 4, 5	Col	-	35S::FPA-YFP Chromatin factor binding
SUF4	1	Col	-	35S::SUF4 Chromatin? factor binding
VIN3	1, 3	Col	-	Chromatin factor binding
VRN1	1, 3	Col	-	Chromatin factor binding



**Figure 56.** Comparaison de la voie de la vernalisation et de la voie de la méthylation induisant la répression de *FLC*. Pour induire cette répression, la voie de la méthylation ne requiert ni *VIN3*, ni un membre du complexe repressif polycomb 2. La répression de *FLC* induite par un faible taux de méthylation se perpétue dans la descendance, contrairement à la répression de *FLC* induite par la vernalisation qui disparaît ("resetting") dans la descendance (d'après Dennis et Peacock, 2007).



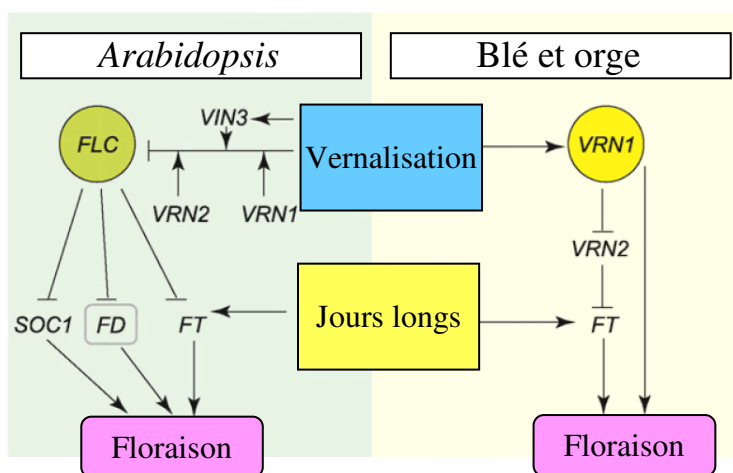
**Figure 57.** Répression par le froid de l'expression de *BvFLC* chez la betterave sucrière. L'axe des abscisses indique le nombre de jours pendant et après le traitement vernalisant (j) et l'axe des ordonnées le taux d'accumulation des ARNm (unité arbitraire). Une diminution progressive et transitoire de l'expression de *BvFLC* est observée au cours d'un traitement vernalisant (5°C). Après le traitement vernalisant (24°C), le taux d'accumulation des ARNm revient au un niveau initial, précédemment détecté avant la vernalisation. Les astérisques indiquent des intervalles de temps durant lesquelles les changements de niveau d'expression sont statistiquement différents (d'après Reeves *et al.*, 2007).

Chez des écotypes d'*Arabidopsis*, présentant un faible niveau de méthylation, il a été démontré que l'expression de *FLC* est réprimée (Genger *et al.*, 2003 ; Finnegan *et al.*, 2005). Cependant, dans ce cas l'inhibition de *FLC* n'implique aucunement la protéine VIN3 et par ce fait, agirait par une voie de régulation distincte (Figure 56 ; Finnegan *et al.*, 2005 ; Dennis et Peacock, 2007). De plus, dans ces deux voies de régulation, la répression de *FLC* n'est pas induite par des modifications de méthylation au niveau de sa séquence. Une hypothèse serait que la réduction de l'expression de *FLC* par un faible taux de méthylation, dépendrait plutôt des modifications de l'état de méthylation d'un autre locus. Celui-ci, réprimerait l'expression de *FLC* et maintiendrait un état chromatinien inactif au niveau de son locus.

Chez plusieurs espèces, telles que le colza, la tomate, la vigne ou la betterave sucrière, des homologues de *FLC* ont pu être identifiés et révèlent des différences dans le contrôle de la floraison (Reeves *et al.*, 2007 ; Dennis et Peacock, 2007). En effet, si l'homologue de *FLC* (*BvFLC*) chez la betterave sucrière agit bien comme un répresseur de la floraison chez des plants transgéniques d'*Arabidopsis*; son inhibition par le froid reste transitoire puisque *BvFLC* s'exprimera de nouveau lors du retour à des températures normales (Figure 57 ; Reeves *et al.*, 2007). En outre, chez le blé et l'orge, trois autres loci associés à la vernalisation ont été identifiés: *VRN1*, *VRN2* (qui n'ont aucun lien avec les gènes d'*Arabidopsis* bien qu'ils portent le même nom) et *VRN3*. Les faibles températures induisent une expression de *VRN1* parallèlement à une répression de *VRN2* qui, lui-même, est un répresseur de *VRN3* (Figure 58). Une exposition en jours longs, va induire l'expression de *VRN3*, qui lui-même stimulera le développement reproductif de l'apex (Yan *et al.*, 2006 ; Dennis et Peacock, 2007).

La plupart des études montrant l'existence de ces mécanismes épigénétiques qui interviennent au cours de la vernalisation, ont été réalisées chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. C'est pourquoi, diverses questions restent en suspens :

- ces mécanismes se produisent-ils chez toutes les plantes et par exemple chez la betterave sucrière ?
- se déroulent-ils de façon identique pour les génotypes d'une même espèce ?
- quel est le rôle exact de l'hypométhylation de l'ADN ?
- quels sont les loci cibles de cette hypométhylation ?



**Figure 58.** Schéma illustrant les voies de régulation de la floraison qui sont différentes entre la plante modèle *Arabidopsis* et les céréales (d'après Dennis et Peacock, 2007).



2. Mise en évidence d'un contrôle épigénétique de la vernalisation, de la dévernalisation et de variations génétiques chez des hybrides de betterave sucrière (**Contrat de recherche 044N avec SES-VanderHave et CPR n°04.08.22 Biotechnocentre avec le Conseil Régional de la Région Centre et publication n°4**).

La betterave sucrière est une plante bisannuelle qui accumule des réserves sous forme de saccharose dans sa racine lors de la première année, puis les utilise pour passer l'hiver et former une hampe florale la seconde année. Il est communément admis que chez la betterave sucrière, il y a une distinction physiologique et temporelle entre la montaison (élongation des entre-nœuds) et la floraison. Ainsi, on peut avoir montaison sans floraison, mais très rarement le contraire (Mutasa-Gottgens *et al.*, 2009). Cette espèce est cultivée à des fins industrielles. En effet, sa culture permet la production de 25 % du sucre à l'échelle mondiale. Cette espèce de jours longs présente un besoin absolu en vernalisation avec des températures comprises entre 2°C et 10°C (Lexander, 1980 ; Smit, 1983).

Cependant, des montaisons sont observées chez certaines betteraves dans les champs dès la première année de végétation. Une possibilité est la présence de variétés annuelles de betterave sucrière qui peuvent apparaître lors de la pollinisation de plantes cultivées par des plantes diploïdes sauvages (Boudry *et al.*, 1993). Ces variétés annuelles possèdent le gène *Bolting* (*B*), qui induit la montaison et la floraison sans besoin de vernalisation (Boudry *et al.*, 1994). Elles peuvent proliférer et devenir des adventices compétitrices dans les zones cultivées, ce qui pose un réel problème aux agriculteurs. Une autre possibilité pour expliquer ce phénomène de montaison dans les champs est due à un faible besoin de vernalisation par les génotypes cultivés. Celui-ci est satisfait par les froids printaniers ou estivaux. Ce phénomène peut être inversé lors d'une exposition de quelques jours à des températures aux alentours de 25 °C et notamment pendant l'été (Lexander, 1980 ; Smit, 1983 ; Perarnaud *et al.*, 2001). Une étude du risque de montaison chez la betterave sucrière en France a été menée parallèlement à une étude météorologique pour l'institut technique de la betterave sucrière et la société SES-VanderHave (Perarnaud *et al.*, 2001 ; <http://www.institut-betterave.asso.fr/>).

**Tableau 9.** Bilan de l'effet thermique des saisons sur le risque de montaison chez la betterave sucrière d'après Perarnaud *et al.* (2001) (disponible sur : <http://www.institut-betterave.asso.fr/>)

Printemps chaud et été chaud	Diminution des valeurs de montée à graine
Printemps chaud et été froid	Amplification des valeurs de montée à graine
Printemps froid et été chaud	Diminution des valeurs de montée à graine
Printemps froid et été froid	Amplification des valeurs de montée à graine

**Tableau 10 :** Comparatif de quelques caractéristiques de la betterave sucrière et d'*Arabidopsis*.

<b>Betterave</b>	<b><i>Arabidopsis</i></b>
Plante bisannuelle ou pluriannuelle cultivée avec besoin de vernalisation ou annuelle non cultivée sans besoin de vernalisation.	Annuelle dite d'hiver ("winter annual") avec besoin de vernalisation ou annuelle dite d'été ("summer annual") sans besoin de vernalisation.
Cycle de vie relativement long (2 ans), plante relativement volumineuse, nombreuses graines, autofécondation peu probable mais elle existe dans certains cas. Possibilité de formation d'hybrides.	Cycle de vie court (6 à 8 semaines), petite plante, nombreuses graines, autofécondation.
Diversité génotypique très importante. Il existe également divers hybrides.	Diversité génotypique importante.
Diploïde (n = 9), grand génome (758 Mpb) non séquencé. Il existe aussi des tétra- et des hexaploïdes et des hybrides triploïdes.	Diploïde (n = 5), petit génome (120 Mpb).
Aucun programme pour le génome nucléaire mais le génome mitochondrial est séquencé. Programmes pour les ESTs sont en cours (+ de 22 759).	Génomes séquencés.
Plante avec ADN hyperméthylé (>30 %).	Plante avec ADN hypométhylé (< 5%).
Méthodes moléculaires classiques à mettre au point. Transgénèse et mutagenèse à améliorer.	Méthodes moléculaires classiques au point. Trangenèse et mutagenèse au point (collections de mutants).
Méristème de taille importante qui peut être isolé pour des analyses.	Méristème très petit difficile à isoler. Les analyses sont effectuées sur la plantule entière.
Intérêt économique (particulièrement en France) : sucre, bioéthanol et production de semences.	Aucun intérêt économique direct.
Bibliographie restreinte.	Bibliographie très importante.

La principale conclusion est que les écarts de taux de montée à graine entre sites et entre années sont davantage expliqués par des températures élevées en fin de printemps-début d'été que par des températures fraîches au printemps (Tableau 9). Ceci accrédite l'idée que le phénomène de dévernalisation joue un rôle important (Perarnaud *et al.*, 2001).

Ainsi, lors de la production sucrière, le caractère "résistance à la montaison" sera recherché par les sélectionneurs. En revanche, pour la production de semences, où il est nécessaire que la montaison et la floraison aient lieu, c'est le caractère 'sensibilité' à la montaison qui intéressera les sélectionneurs. De ce fait, un des paramètres importants dans l'amélioration de la betterave sucrière porte sur la sensibilité à la vernalisation et à la montaison qui s'ensuit. Actuellement, le caractère de montaison dans les lignées parentales et les semences commercialisées est estimé grâce à des pratiques longues et coûteuses d'essais aux champs et en chambres de culture.

Bien que l'existence d'un contrôle épigénétique soit déjà bien établi chez des plantes annuelles telles que *Arabidopsis* et certaines céréales, il n'en est rien chez la betterave sucrière. De plus, même chez ces mêmes plantes le rôle de la méthylation de l'ADN reste encore peu clair. En outre, l'étude d'homologues de gènes d'*Arabidopsis* suggère un contrôle différent de la floraison.

La betterave sucrière est une plante modèle intéressante pour l'étude de la vernalisation et de la dévernalisation. En outre, elle présente deux caractéristiques fondamentales qui la distinguent de la plante modèle *Arabidopsis* sur laquelle a été obtenue la majorité des données moléculaires (Tableau 10). Tout d'abord, la betterave est une plante présentant un pourcentage de méthylation global du génome important ( $> 30\%$ ) contrairement à celui d'*Arabidopsis* qui est hypométhylé ( $5\% <$ ). De plus, le méristème de la betterave est assez volumineux pour être isolé et étudié séparément alors que celui d'*Arabidopsis* est trop petit. Cependant, le génome de la betterave n'est pas séquencé contrairement à celui d'*Arabidopsis*. En effet, seul son génome mitochondrial a été séquencé. Quelques programmes de séquençage d'ESTs sont néanmoins en cours. Quelques banques de données sont ainsi accessibles sur internet :

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=genomeprj&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list\\_uids=12562](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=genomeprj&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=12562)

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=PureSearch&db=nucleotide&details\\_term=txid161934\[orgn\]%20AND%20gbdiv\\_est\[prop\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=PureSearch&db=nucleotide&details_term=txid161934[orgn]%20AND%20gbdiv_est[prop])

[http://www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/T\\_index.cgi?species=beet](http://www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/T_index.cgi?species=beet)

<http://genomics.msu.edu/sugarbeet/index.html>

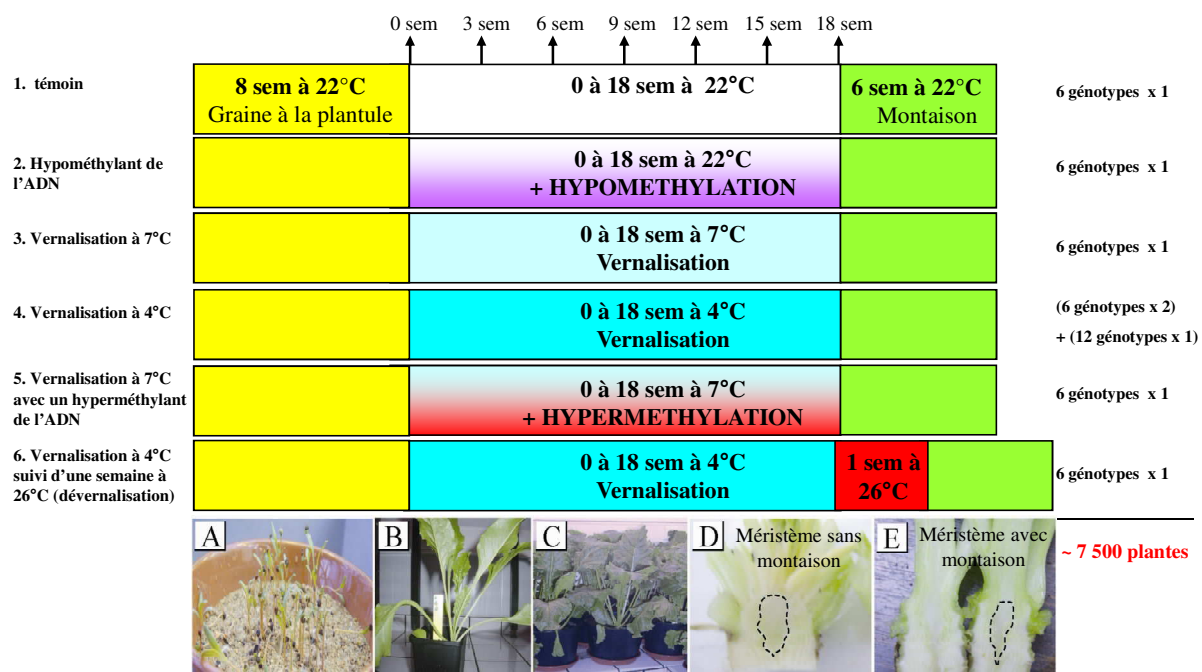
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=108469695>

Nos principaux objectifs sont de :

- (1) mettre en évidence l'existence d'un contrôle épigénétique lors de la vernalisation et de la dévernalisation chez la betterave sucrière ;
- (2) caractériser les variations de différents paramètres épigénétiques et ceci chez plusieurs hybrides ;
- (3) identifier par une approche gènes candidats, des gènes régulés de manière épigénétique lors de la vernalisation.

Dans cette optique, une étude cinétique de 6 mois des modifications épigénétiques s'opérant avant, pendant et après des traitements vernalisant, dévernalissant, hypo- ou hyper-méthylant de l'ADN et à température ambiante a été réalisée (Figure 59). Les variations de quatre paramètres épigénétiques tels que le pourcentage de méthylation global de l'ADN, le ratio d'acétylation des histones et leurs activités enzymatiques associées, ont été mesurées dans l'apex caulinaire de plusieurs hybrides de betterave sucrière (~ 8000 plantes) présentant une sensibilité différente à la montaison (Tableau 11).

Dans un second temps, une analyse comparative du profil de méthylation et d'expression d'homologues de la voie de vernalisation chez *Arabidopsis* a été réalisée afin d'identifier par une approche gène candidat de potentiels marqueurs épigénétiques de la sensibilité à la vernalisation chez la betterave sucrière.



**Figure 59.** Schéma résumant les différents traitements effectués sur 6 à 18 génotypes de betteraves sucrières. Pour chaque traitement et durées de traitement (0, 3, 6, 9, 12, 15 et 18 semaines), 14 apex caulinaires sont prélevés pour chaque génotype. Dix autres plantes sont placées à 22°C pendant 6 semaines, jusqu'à l'apparition éventuelle de la hampe florale. Les apex sont alors prélevés. A, plantules après 8 semaines à 22°C ; B, plants de betterave laissés 8 semaines à 22°C puis 18 semaines à 4°C ; C, plants de betterave laissés 30 semaines à 22°C ; D, coupe transversale d'un apex caulinaire de betterave après 18 semaines de vernalisation. La partie prélevée de l'apex correspond à une zone contenant le méristème mais avec le moins possible de tissus différenciés associés. Cette partie est indiquée par la zone en pointillé ; E, coupe transversale d'un apex caulinaire de betterave après 18 semaines de vernalisation et 6 semaines en conditions optimales pour l'induction de la montaison. La partie prélevée de l'apex différencié est indiquée par la zone en pointillé.

**Tableau 11 :** Abréviations et nature de génotypes de betterave sucrière utilisés dans cette étude

Code	Genotype
G1	Femelle A
G2	Hybride (= A*P1)
G3	Hybride (= B*P1)
G4	Femelle C
G5	Femelle B
G6	Hybride (= C*P1)
G7	Lignée femelle
G8	Lignée femelle
G9	Lignée femelle
G10	Lignée femelle
G11	Lignée femelle
G12	Lignée femelle
G13	Lignée femelle
G14	Lignée femelle
G15	Pollinisateur tétraploïde
G16	Pollinisateur tétraploïde
G17	Pollinisateur diploïde
G18	Pollinisateur diploïde

**Publication n°4: Trap-Gentil, M.-V., Lafon-Placette, C., Delaunay, A., Hébrard, C., Brignolas, F., Hagège, D., Joseph, C., Lefebvre, M., Barnes, S and Maury, S.** (en préparation). Kinetics and genetic variations of epigenetic marks in vernalized or devernalized sugar beet hybrids with distinct bolting sensitivities.

## **Kinetics and genetic variations of epigenetic marks in vernalized or devernalized sugar beet hybrids with distinct bolting sensitivities**

Marie-Véronique Trap-Gentil<sup>1,2</sup>, Clément Lafon-Placette<sup>1,2</sup>, Alain Delaunay<sup>1,2</sup>, Claire Hébrard<sup>1,2</sup>, Franck Brignolas<sup>1,2</sup>, Daniel Hagège<sup>1,2</sup>, Claude Joseph<sup>1,2</sup>, Marc Lefebvre<sup>3</sup>, Steve Barnes<sup>3</sup> and Stéphane Maury<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES EA 1207, Faculté des Sciences, Université d'Orléans, rue de Chartres, BP 6759, 45067 Orléans Cedex 2, France.

<sup>2</sup> INRA, USC2030 Arbres et Réponses aux Contraintes Hydrique et Environnementales (ARCHE), F-45067 Orléans, France.

<sup>3</sup> SES-VanderHave N.V. /S.A., Soldatenplein Z2 nr15, Industriepark, B-3300 Tienen, Belgium.

Financial source: Conseil Régional de la Région Centre and the Ministère de la Recherche, France.

Experimental stations: SESVanderHave in Belgium and the Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures at the University of Orléans in France.

Author for correspondence: Stéphane Maury

Email: [stephane.Maury@univ-orleans.fr](mailto:stephane.Maury@univ-orleans.fr)

Tel: +33 (0)2 3841 7022

Fax: +33 (0)2 3841 7022

**Keywords:** DNMT, epigenetic, *FLC*, *FWA*, HDAC, vernalization, sugar beet, *VIN3*, *VRN2*

## **Abstract**

Although an epigenetic control of vernalization has already been demonstrated in annual plants such as *Arabidopsis* and cereals, the role of DNA methylation in this process remains unclear. In order to estimate the impact of genetic variation on the ability of sugar beet to respond to the vernalization signal, we have monitored, in shoot apices from hybrids with distinct bolting traits, various epigenetic changes occurring in response to both changes in temperature and various treatments affecting DNA methylation. Hypomethylating treatments were not sufficient to induce bolting while DNA hyper-methylation inhibits and delays bolting. Furthermore, course and amplitude of changes were identified as critical points for bolting induction and rapidity. Negative correlations were established between levels of DNA methylation or histone H3 acetylation ratios and the percentage of bolting plants. The sugar beet homologs of *VIN3* and *VRN2*, but not of *FLC*, were directly regulated in the course of the vernalization process through changes in DNA methylation within their coding sequences. Our data show that both the kinetics and the amplitude of epigenetic variations were correlated to the induction and rapidity of bolting in hybrids. This relationship was observed at the genome-wide as well as the locus-specific levels, opening perspectives for sugar beet breeding.



## **Introduction**

Vernalization, the acquisition or acceleration of competence to bolt and flower that results from exposure to extended periods of low temperatures that mimic winter conditions, typically relieves a block to the photoperiod pathway (Chouard, 1960; Schmitz and Amasino, 2007). In some species, vernalization can be reversed by devernalization, an exposure to a few days at temperatures ranging from 25°C to 35°C (Purvis and Gregory, 1952). Mitotic activity in meristematic cells is required during vernalization for the subsequent floral organs formation. Early studies have associated vernalization to a form of cell memory susceptible to be maintained for weeks until optimal light conditions (Lang, 1965). This phenomenon is transmissible through mitosis but not through meiosis, therefore pointing to an epigenetic mode of regulation (Metzger, 1988). The finding that the effects of vernalization on flowering can be mimicked by hypomethylating treatments and the early flowering phenotype of plants displaying genome-wide defects in DNA methylation suggested the involvement of this mechanism in the vernalization process. The hypothesis for an epigenetic regulation of vernalization phenomenon was strengthened (Burn et al., 1993; Brock and Davidson, 1994 ; Finnegan et al., 1998 ; Fieldes et al., 2005). Nevertheless, *Arabidopsis* ecotypes with no strong response to vernalization and stable low levels of global DNA methylation were found to flower later than control lines with normal levels of DNA methylation. These observations have caused some confusion concerning the possible role of DNA methylation in the vernalization response (Genger et al., 2003; Finnegan et al., 2005).

The molecular mechanism supporting cell memory of vernalization was elucidated in the model annual plant *Arabidopsis thaliana*. *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) expression is repressed both in vernalized plants and plants with low level of genomic methylation, which in turns de-represses flowering. The induction of the *VERNALIZATION INSENSITIVE 3* (*VIN3*) gene by cold promotes the histone 3 (H<sub>3</sub>) deacetylation at the *FLC* locus. This epigenetic modification relieves *FLC*-mediated repression of flowering (Bastow et al., 2004; Sung and Amasino, 2004). Moreover, prolonged cold conditions promote histone 3 methylation at both lysine 9 and 27 (H<sub>3</sub>K9 and H<sub>3</sub>K27) through the recruitment of a complex containing the *VERNALIZATION 2* (*VRN2*) protein. These epigenetic modifications lead to a stable repression of *FLC* that will be reset in the progeny (Bastow et al., 2004; Sung and Amasino, 2004). Further investigations have shown that the down-regulation of *FLC* expression in plants with low levels of DNA methylation does not involve *VIN3* and consequently occurs by a distinct pathway (Finnegan et al., 2005). Thus, in these two

pathways, *FLC* is not regulated directly by modifications of DNA methylation. It has been proposed that the reduction of *FLC* activity by low methylation is likely to depend on a change of methylation status at another locus, resulting in low *FLC* expression and formation of inactive chromatin structures in the *FLC* gene region (Finnegan et al., 2005; Dennis and Peacock, 2007; Schmitz and Amasino, 2007).

The identification of orthologs of genes involved in the vernalization pathway was reported in several plant species (Reeves et al., 2006; Dennis and Peacock, 2007) and revealed inter-specific differences in the control of flowering process. For instance, whereas the sugar beet *FLC*-like gene (*BvFLC*) behaves as a repressor of flowering in transgenic *Arabidopsis* plants, its transcriptional activity is restored upon return to warmer temperatures (Reeves et al., 2006). Sugar beet (*Beta vulgaris altissima*) is a biennial root crop that provides 25 % of world sugar. This long-day species exhibits an absolute requirement in vernalization, between 2°C and 10°C, depending on the genotype, whereas *Arabidopsis* will ultimately flower under most environmental conditions due to promotion by autonomous pathway genes (Koornneef et al., 1998). In vernalized sugar beet, a rapid elongation of the stem (bolting) associated with the use of stored sucrose is followed by the development of an indeterminate inflorescence. This process can be reversed at temperatures around 25° C (devernalization) depending on the genotype (Lexander, 1980, Smit, 1983; Perarnaud et al., 2001). It is widely accepted that sugar beet plants can bolt without flowering, but they rarely flower without bolting (Mutasa-Gottgens et al., 2008). Cold spring temperatures and predicted global climate changes increase the risk of exposing sugar beet crops to vernalizing temperatures during the early part of the season (Perarnaud et al., 2001; Porter and Semenov, 2005; Thomas et al., 2008). Bolting resistance is an essential trait for hybrid beet crops, although it needs to be reversible in order to enable seed production (Mutasa-Gottgens et al., 2008; Reeves et al, 2006). In this context, our aims were (i) to determine if vernalization/devernalization are epigenetically regulated in biennial sugar beet, (ii) to study vernalization responses of several sugar beet hybrids and (iii) to characterize epigenetically-regulated genes using a gene candidate approach. In order to estimate the impact of genetic variation in the ability of sugar beet to respond to vernalization signal, we have monitored in shoot apices from hybrids with distinct bolting traits the epigenetic changes occurring in response to variations in temperature and to treatments affecting directly DNA methylation. We studied statistical correlations were also tested between levels of genome-wide epigenetic marks and the percentage of bolting plants. Relative mRNA abundance and DNA methylation profile within coding sequences of four orthologs of genes involved in the vernalization pathway (*FLC*, *FWA*, *VIN3* and *VRN2*) were

assessed during the vernalization process. Our data show that both the course and the amplitude of epigenetic variations were correlated to the induction and rapidity of bolting in hybrids. This relationship was observed at the genome-wide as well as the locus-specific levels, opening perspectives for sugar beet breeding.

## **Results**

### **Genetic variation for bolting sensitivity traits in sugar beet after vernalization, devernalization and/or DNA hypo-/hyper-methylating treatments**

The bolting index (BI), that corresponds to the percentage of bolting plants and the bolting delay (BD), corresponding to the average number of days required for bolting initiation, were determined in six biennial genotypes of sugar beet (named G1 to G6), in order to characterize their bolting sensitivity (Fig.1). These genotypes were submitted to various durations (0, 3, 6, 9, 12, 15 or 18 weeks) of temperature treatments (Table S1): control treatment at 22°C, cold treatments at 7°C or 4°C (vernalization) and cold treatment at 4°C followed by one week at 26°C (devernalization).

A prolonged cold period at 4°C for at least 6 weeks was necessary to observe bolting in all genotypes, since no bolting was seen in plants cultivated at 22°C (Fig. 1A, 1B, 1C, 1G, 1H and 1I). During vernalization, BIs and BDs increase and decrease respectively with the duration of treatment. The lowest temperature used (4°C) was more efficient (G1 to G4) or even necessary (G5 and G6) to induce a strong and early bolting (Fig. 1B, 1C, 1H and 1I) as illustrated by G1 genotype reaching 100% bolting after only 9 weeks at 4°C but needed 18 weeks at 7°C. This was confirmed by the mean values of BIs (from  $23.3 \pm 6.8\%$  for 7°C to  $34.0 \pm 6.7\%$  for 4°C) and BDs (from  $31.8 \pm 3.3$  days for 7°C to  $25.6 \pm 1.8$  days for 4°C). Comparable genetic variation for bolting sensitivity was observed with three genotypes (G1, G2 and G3) which were considered as sensitive (S) for bolting in this study: they bolted after shorter cold treatment (9 weeks at 4°C), reached stronger BIs (100% at 4°C) and exhibited lower BDs (under 25 days after 18 weeks at 4°C) than the three other genotypes (G4, G5 and G6) which were classified as resistant (R). When plants vernalized at 4°C were submitted to a devernalization treatment (one week at 26°C) a decrease of the mean value of BI was observed (from  $34.0 \pm 6.7\%$  for vernalization to  $26.7 \pm 6.4\%$  for devernalization). Devernalization treatment was particularly efficient on R genotypes (Fig. 1D and 1.J). No variation was observed in the mean BD value.

### **Genetic variations of global methylation rate (GMR) in shoot apex**

Plants grown at 22°C exhibited limited variation in the global percentage of cytosine methylation (%mC ~40%) in shoot apices, until a sharp fall in methylation after 18 weeks (Fig. 2A). The box plot shows that noteworthy genetic variation is only seen around 12 weeks, with R genotypes displaying significantly higher %mC (at  $P \leq 0.05$ ) than the S plants. The moderate variation in %mC (from about 28 to 36%) that is seen before any treatment at (0 week) reflects the higher levels in %mC in S, relative to R genotypes. V7 treatment resulted in a transient and earlier hypomethylation event at 12 weeks, with few variations between genotypes (Fig. 2B). Vernalization with a lower temperature (4°C) induced strong cyclic variation in %mC ranging from 83% (9 weeks) to 17% (15 weeks) and two decreases of DNA methylation at 6 and 15 weeks respectively (Fig. 2C). A significant difference (at  $P \leq 0.05$ ) was observed at 18 weeks between S and R genotypes, these last ones showing the lowest values. Variations of %mC in V4 plants were confirmed in a similar study repeated on 18 biennial sugar beet genotypes (Fig. S1). Devernalization of vernalized plants at 4°C was still followed by strong variations in DNA methylation (Fig. 2D) but the maximum was delayed at 12 weeks. Significant genetic variations (at  $P \leq 0.05$ ) were found at 9 and 15 weeks in good relation with the distinct mean values of the R and S genotypes. Indeed, exposure to one week at 26°C suppressed the significant differences of %mC between unvernallized S and R genotypes (0 week; Figure 2.D).

After the different treatments at various durations, a subset of plants for each treatment was cultivated for 6 weeks in optimal bolting conditions (see materials and methods). GMRs of control plants (22°C) decreased progressively (from 78% at 0 week to 5% at 18 weeks) with considerable genetic variations without significant differences between R and S genotypes (Fig. 2E). In comparison, 7°C vernalized plants (after optimal bolting conditions) showed one intermediate hypomethylation event at 6 weeks and significant differences (at  $P \leq 0.05$ ) between R and S genotypes at 6 and 12 weeks (Fig. 2F); with R genotypes exhibiting higher %mC. A similar profile was found in 4°C vernalized plants (after optimal bolting conditions) except that the hypomethylation event was at 9 weeks. Weak genetic variations were found but %mC of S genotypes was significantly higher than R genotypes at 9 and 15 weeks (Fig. 2G). Devernalized plants showed rather stable %mC except a hypomethylation event at 15 weeks, where R genotypes displayed significantly higher %mC. For all treatments, the most important difference between plants before or after the bolting treatment was an hyper-methylation (two-fold increase) detected at 0 week (Figures 2A and 2E).

In order to assess the role of DNA hypo- and hyper-methylation in sugar beet bolting, chemical treatments were performed using DNA hypo- and hyper-methylating drugs (see materials and methods). The corresponding %mCs were measured and the ratios between values of treated and non treated plants were calculated (Fig. S2). Significant DNA hypo- and hyper-methylation were found for most of the genotypes (ratios from 0.1 to 2.1 respectively). Interestingly, S genotypes were globally more affected by hyper-methylating treatments, while R genotypes were more strongly hypo-methylated. However, DNA hypo-methylating treatment was not sufficient to induce any bolting in plants cultivated at 22°C (Fig. 1E and 1.K), while treatment by a DNA hyper-methylating agent of plants vernalized at 7°C (Fig. 1F and 1.L) strongly decreased BI values (from  $23.3 \pm 6.8$  % for V7 to  $19.4 \pm 5.0$ % for V7H<sup>+</sup>) and increased BD (from  $31.8 \pm 3.3$  days for V7 to  $40.1 \pm 2.1$  days for V7H<sup>+</sup>).

### **Genetic variations of histone H3 acetylation ratio in shoot apex**

The histone H<sub>3</sub> acetylation ratio ( $R_{AcH3}$ ) corresponds to the ratio of acetylated H<sub>3</sub> over non-acetylated H<sub>3</sub> as quantified by immunodetection (see materials and methods). Control plants had  $R_{AcH3}$  over one that progressively decreased from 3.5 at 0 week to 1.7 at 18 weeks (Fig. 3A). Major genetic variation is only seen at 0 week, with R genotypes displaying significantly higher values (at  $P \leq 0.05$ ) than S ones (from 4.5 to 1.5). Despite a strong decrease in  $R_{AcH3}$  genetic variation at 6 weeks, R genotypes still revealed significantly higher values than S ones (from 2.3 to 1.4). The vernalization treatment at 7°C resulted in a stronger decrease of H<sub>3</sub> acetylation which was proportional to the duration of the cold period with  $R_{AcH3}$  values ranging from 3.5 at 0 week to 0.1 at 18 weeks (Fig. 3B). Vernalization at a lower temperature (4°C) was not followed by significant variations of  $R_{AcH3}$  relative to control plants. However, the plants submitted to this treatment displayed a wide range of genetic variation (from 1.3 to 9), independently from their bolting characteristics (Fig. 3C). Devernalization following a 4°C treatment induced a stable hypo-acetylation of histone H<sub>3</sub> ( $R_{AcH3} \sim 0.5$ ) without significant genetic variation (Fig. 3D).

For each treatment, few changes were observed between plants before or after transfer to optimal bolting conditions (Fig. 3E, F, G and H). The most significant change was found for 4°C vernalized plants placed in optimal bolting conditions that displayed successively lower (at 0 to 6 weeks) and higher (at 9 to 18 weeks) genetic variations of their  $R_{AcH3}$  than 4°C vernalized plants before bolting conditions (Fig. 3C and 3.G). Interestingly, these variations were associated with significantly higher and lower  $R_{AcH3}$  for S genotypes at 12 and 18 weeks respectively.

### **Genetic variation in enzymatic activities of DNA methyltransferase and Histone deacetylase and in the accumulation of the corresponding isoforms in shoot apex after vernalization or devernalization treatments**

In order to estimate the role of: DNA methyltransferase, histone deacetylase and their corresponding isoforms in the associated patterns of chromatin marks; enzyme activities and immunodetections were performed. In 4°C-vernalized plants, total DNMT activity were found to range from  $0.2 \cdot 10^{-8}$  (6 weeks) to  $2.8 \cdot 10^{-8}$  pkat.mg of protein<sup>-1</sup> (15 weeks) with two other minima at 12 and 18 weeks respectively (Fig. 4A). The observed genetic variations were not associated to significant differences between R and S genotypes. Comparatively, devernalized plants showed an earlier first minimum of DNMT activity at 3 weeks and the disappearance of the maximum peak at 15 weeks (Fig. 4B). Strongest genetic variation in DNMT activity at 3 weeks was related to significant differences (at  $P \leq 0.05$ ) between R and S genotypes, although the activities were similar at other time points. After optimal bolting conditions, 4°C vernalized plants displayed rather stable DNMT activities ( $\sim 1.0 \cdot 10^{-8}$  pkat.mg of protein<sup>-1</sup>) except for a peak at 3 weeks (Fig. 4C). In contrast, devernalized plants showed a decrease in DNMT activity between 0 and 6 weeks followed by a progressive increase until 18 weeks. Immunodetection using antibodies raised against the carrot-DNMT class 1 recombinant protein (homologue of *Arabidopsis* MET1) revealed four main bands: one over 100 kDa (size of the recombinant DNMT protein) and smaller ones with sizes of 90, 60 and 30 kDa respectively (Fig. 4E). In vernalized plants, many supplementary bands were observed. Comparison of protein amounts between vernalized and devernalized plants (Fig. 4F) revealed a strong reduction of the 90 kDa band and a disappearance of the 30 kDa band in devernalized plants. Nevertheless, no significant difference could be observed between R and S plants in any treatments.

In vernalized plants, a transient increase (two-fold) of total HDAC activity was seen, with a maximum at 12 weeks that showed a significant difference (at  $P \leq 0.05$ ) between R and S genotypes (Fig. 5A). In comparison, devernalized plants were characterized by higher activities before 6 weeks and an abrupt decrease of HDAC activities at 9 weeks that stabilized till 18 weeks (Fig. 5B). An important genetic variation was noticed at 15 weeks with lowest values for R genotypes. After transfer to optimal bolting conditions (Fig. 5C and D), plants displayed stable HDAC levels, but with a decrease at 12 and 15 weeks or 15 and 18 weeks for vernalized and devernalized treatments respectively. Significant differences between R and S genotypes were found at 18 weeks and 12 weeks for vernalized and devernalized plants respectively (Fig. 5C and 5D). Immunodetection using antibodies raised against the three

maize HDAC classes (HD1A, HD1B and HD2, respectively) revealed six main bands of 100 kDa, 90 (size of the recombinant HD1A protein), 58, 55, 48 and 40 kDa respectively (Fig. 5E). For each antibody class, the accumulation of the corresponding HDACs was compared in vernalized and devernalized plants (Fig. 5F, G and H). Several differences were found between the two treatments, including a higher accumulation of the HD2 55 and 40 kDa isoforms in vernalized than in devernalized plants. In vernalized plants, differences could be also observed between R and S plants.

### **Correlation between bolting sensitivity traits and epigenetic modifiers**

Two separate principal component analyses (PCAs) were performed using means values of epigenetic parameters in vernalized or devernalized plants (Fig. 6). In both PCAs, the bolting variables (BI and BD) were projected as supplementary variables on these planes. In vernalized plants, the first two principal components explained 61.6 % of the variability, with 34.5 % for F1 alone (Fig. 6A). The F1 axis was mainly defined by %mC and DNMT activity, while the F2 was by R<sub>AcH3</sub> and HDAC activity. Negative correlations were detected between scores of F1 and F2 axes and BI (Table I). BI was also negatively correlated to BD, %mC and R<sub>AcH3</sub> while DBI, corresponding to the decrease in the number of plants which were bolt after devernalization treatment, scaled negatively with BD and positively with %mC.

In devernalized plants, the first two components explained 60.8 % of the variability, with 36.7 % for the first component (Fig. 6B). The first component was mainly defined by HDAC activity. Negative correlations were established between scores of F1 and BI (Table I). BI values were also negatively correlated with BD, DNMT and HDAC activities, while DBI scaled negatively with BD and positively with %mC. Negative correlations were established between scores of F2 and BD.

### **Specific mRNA accumulation and methylation profiles in shoot apices and their relationship in sugar beet homologous sequences of *Arabidopsis* vernalization pathway genes: a gene candidate approach for the characterization of bolting sensitivity markers**

Putative homologs of the *Arabidopsis thaliana* *FWA*, *VIN3* and *VRN2* genes were identified by performing a TBLASTX search on the sugar beet EST databases (see materials and methods). One homologous EST sequence at least was identified for each gene. The sequence corresponding to a sugar beet *BvFLC* gene has already been published (Reeves et al, 2006). Total RNAs were isolated from two S genotypes (G7 and G8) and two R genotypes (G12 and G13) after 0, 3 or 15 weeks of vernalization at 4°C. Semi-quantitative RT-PCR



analyses of *BvFLC*, *BvFWA*, *BvVIN3* and *BvVRN2* were performed (Fig. 7). For *BvFWA*, *BvVIN3* and *BvVRN2* only one band of the expected size (600 bp, 240 bp and 480 bp respectively) was visible on gel, while two bands called *BvFLCa* (400 bp) and *BvFLCb* (300 bp) were detected for *BvFLC* (Fig. 7A). This last result is in agreement with previous report on the mRNA splicing variants of sugar beet *FLC* gene (Reeves et al., 2006). The four genes displayed variable mRNA abundance in the shoot apex of all genotypes for the different durations at 4°C (Fig. 7B to E). Significant differences between R and S genotypes were only obtained for *BvFLC* (Fig. 7A and 7B). Thus, S genotypes showed a transient decrease of both *BvFLCa* and *b* mRNA levels at 3 weeks, while R genotypes exhibited a constant increase of *BvFLC* mRNA levels between 0 to 15 weeks. *BvFWA* mRNA accumulation also showed a transient decrease at 3 weeks except for one R genotype (G13) that surprisingly displayed a very low expression level (Fig. 7C). *BvVIN3* and, to a lesser extent, *BvVRN2*, showed an important mRNA accumulation which magnitude was positively correlated to the duration of the vernalization treatment (Fig. 7D and 7E).

Bisulfite sequencing was used to determine the methylation status of the four genomic sequences encoding these transcripts. DNA was isolated from the shoot apex of one S (G7 or G8) and one R genotype (G12 or G13) after 0, 3 or 15 weeks of vernalization and treated with sodium bisulfite, which results in the conversion of unmethylated cytosines to uracils but does not affect methylated cytosines. The relative level of methylation of each cytosine in CG, CNG (N could be A, T, C or G) or asymmetric CHH (H could be A, T or C) contexts is shown in Figure 8. The *BvFLC* region analyzed was found to be strongly methylated with limited variations between genotypes or in relation with vernalization duration. In contrast, the 5' part of the *BvVIN3* region presented several modifications of methylation levels in all three contexts, although more frequently in CHH sites. Thus, differences in methylation patterns were established both between R and S genotypes (sites C1, C10 and C15) and between treatment durations (sites C4, C8 and C9, Fig. 8). A progressive hyper-methylation of the *BvVIN3* region was observed during vernalization, especially in CNG context. The *BvVRN2* region also showed several modifications of methylation levels in the three contexts. Methylation polymorphisms that could discriminate durations of vernalization (C20 and C28) or bolting sensitivity (C2 to C7, C15, C16, C22 and C35 to C37) were established.

Several positive linear correlations (Pearson's coefficient,  $r$ ) were established between the mRNA accumulation levels of the four vernalization genes, for distinct cold durations (Table II). *BvFWA* mRNA level was negatively correlated to the global %mC determined in the shoot apex. The corresponding levels of *BvFLCa* and *b* were also strongly correlated to

the methylation status of CG and CHH, respectively while *BvVRN2* mRNA accumulation level scaled positively with the levels of methylation in CNG context. *BvVIN3* and *BvVRN2* mRNA accumulation levels were also strongly correlated to the level of methylation of one cytosine residue in CNG contexts: C4 and C24 respectively. Finally, a positive correlation was detected between the accumulation of *BvVRN2* transcripts and the values of BD.

## **Discussion**

### **Bolting and global DNA methylation**

In our experimental display, the bolting of different sugar beet hybrids could only be obtained with an exposure to cold temperatures. Moreover, both the extent and rapidity of the bolting were dependent on the intensity and duration of the cold treatment, as well as on the genotype of the hybrids. These results are in agreement with previous reports (Lexander, 1980; Smit, 1983). Devernalization through a brief exposure to warmer temperatures was shown to reduce the bolting index in a genotype dependent way without affecting the value of bolting delay. The importance of devernalizing temperatures during the spring-summer period in field-grown sugar beets has already been reported (Perarnaud et al., 2001). This study showed that bolting values observed in France during the 1971-2000 period were affected more by devernalization than by vernalization, highlighting the need for complementary data on this phenomenon.

In order to assess the role of DNA methylation in bolting induction and time course in sugar beet, DNA hypo- or hyper-methylation were induced through chemical treatments with 5-azacytidine and hydroxyurea. Both these substances have been successfully used to modify genomic DNA methylation rates in sugar beet cell lines (Causevic et al., 2005; Causevic et al., 2006). In our study, DNA hypo-methylation induced by 5-azacytidine was not sufficient to promote bolting in biennial sugar beet, a result which is consistent with what was observed in *Xanthium strumarium* and *Lemna paucicostata* (Kondo et al., 2007) but opposite to what was obtained in *Arabidopsis*, wheat and flax (Burn et al., 1993; Brock and Davidson, 1994; Finnegan et al., 1998; Fieldes et al., 2005). Interestingly, to decrease the number of bolting vernalized plants and increases number of days require for bolting. To our knowledge, this is the first time that the effects of DNA hyper-methylation on flowering and bolting are demonstrated, although previous studies on sugar beet cell lines have already underlined the influence of DNA hyper-methylation on morphogenesis (Causevic et al., 2005; Causevic et al., 2006). Several reports have proposed that DNA hyper-methylation could be associated with gene silencing, tissue specific expression and maintenance of cell differentiation (Berdasco et al., 2008) or to constitutive high expression, depending on the promoter or transcribed methylation region (Zhang et al., 2006). Ageing of shoot apices (during 18 weeks at 22°C) was shown to be associated with a moderate DNA hyper-methylation followed by a late and weak DNA hypo-methylation. Several reports about plant ageing have already

reported DNA methylation modifications but with contradictory trends (Fraga et al., 2002; Sha et al., 2005). Thermal treatments were also shown to affect DNA methylation, as previously reported for cold and vernalization (Finnegan et al., 1998; Steward et al., 2000; Genger et al., 2003; Causevic et al., 2005). In *Arabidopsis*, vernalization causes a transient decrease in methylation which reverts quickly to normal methylation rates upon return to normal growth temperatures (Finnegan et al., 1998), whereas no such reversion is observed in wheat (Sherman and Talbert, 2002). This result on *Arabidopsis* suggests that DNA methylation changes do not only affect loci related to vernalization. Our main finding was that variations in DNA methylation corresponded not only hypo-methylation event but to dynamic and reversible hypo- and hyper-methylation events which amplitude and time course were dependent on the temperature of vernalization, devernalization, the duration of the treatment and the plant genotype. Thus, decreasing the vernalizing temperature was shown to increase the amplitude of the variations, while devernalization was able to delay the hyper-methylation event. Furthermore, genotypes reported to be resistant or sensitive to bolting exhibited significant differences in DNA methylation before and at the end of the treatments, in agreement with the significant correlation previously established between global levels of DNA methylation and bolting index.

DNA methylation is carried out by several DNA methyltransferases (DNMTs), which catalyze the transfer of a methyl group to cytosine (Finnegan and Kovac, 2000). Here, DNMT activity showed cyclic variations in vernalized shoot apices, depending on cold durations and genotype. This activity has already been shown to change with morphogenetic states in sugar beet cell lines (Causevic et al., 2005) and to decrease during cold treatment in maize roots (Steward et al., 2002). Differences observed with devernalized shoot apices could certainly contribute to changes in DNA methylation, even if DNMT activity could not be correlated to DNA methylation, as previously reported in sugar beet cell lines (Causevic et al., 2005). Indeed, the overall DNA methylation level is the result of the balance between total DNMT activity, the mitotic index and the reverse action of DNA glycosylases/lyases. Nevertheless, in PCA analysis the results obtained for vernalized plants, the first component, which is mainly defined by the opposition of DNA methylation and DNMT activity, is strongly correlated to the bolting index. Several DNMT isoforms were assessed in hybrid sugar beet in accordance with an organization in multigenic families and limited proteolysis previously reported in other plants and particularly in sugar beet (Finnegan and Kovac, 2000; Causevic et al., 2005). Our results showed that the limited proteolysis of DNMT observed during vernalization is

strongly reduced during devernalization and could probably participate to the regulation of the enzymatic activity.

### **Bolting and global histone acetylation**

Ageing of the shoot apex was not associated with significant changes in histone H<sub>3</sub> acetylation in sugar beet, although significant differences between R and S bolting genotypes were found before any treatment as previously reported for DNA methylation. Global histone H<sub>3</sub> acetylation was decreased by the highest vernalizing temperature only, by devernalization and after drug-induced DNA hyper-methylation (data not shown). Interestingly, these treatments correspond to non optimal bolting conditions, suggesting a specific chromatin state in this situation. This is confirmed by the negative correlations established between histone H<sub>3</sub> acetylation ratios and the percentage of vernalized bolting plants. No data are available on the global acetylation of histone during vernalization in any other plant. However, Deng et al., (2007) showed that transgenic plants defective in histone acetyltransferase displayed developmental defects including delayed flowering. Furthermore, variations in histone acetylation have already been reported during development (Law and Suttle, 2005; Causevic et al., 2006) and in response to abiotic stress (Tsuji et al., 2006). Several studies described locus specific variations of histone acetylation, such as *FLC* during vernalization (Bastow et al., 2004; Sung and Amasino, 2004; Finnegan et al., 2005; Finnegan and Denis, 2007).

Acetylation level corresponds to a balance between HAT and HDAC enzymatic activities and the mitotic index (Loidl, 2004). Here, HDAC activity displayed weak transient activation. This activity has already been shown to vary with the morphogenetic states in sugar beet cell lines (Causevic et al., 2005) and to be modulated by cold treatment in rice (Fu et al., 2007). Furthermore, FVE encoding a homolog of the mammalian retinoblastoma-associated protein is a component of a histone deacetylase (HDAC) complex and regulates both flowering time and cold response in *Arabidopsis* (Kim et al., 2004). The transiently higher HDAC activity in devernalized shoot apexes could explain the corresponding decrease of histone H<sub>3</sub> acetylation. In PCA of vernalized plants, the F2 axis, which is mainly defined by the opposition of histone H<sub>3</sub> acetylation and HDAC activity, is strongly correlated with the bolting index. Several HDAC isoforms were detected in hybrid sugar beets, consistent with an organization in multigenic families, as well as a limited proteolysis previously report in other plants and particularly in sugar beet (Pipal et al., 2003; Loidl, 2004; Causevic et al., 2005). Vernalization and devernalization were shown to be associated with the accumulation of distinct isoforms, suggesting specific regulation and distinct roles for each HDAC class.

### **Bolting genes and locus specific DNA methylation**

Two transcripts were detected for *BvFLC*, in agreement with a previous report on its differential mRNA splicing (Reeves et al., 2006). *BvFLC* has been already shown to be a flowering repressor in transgenic *Arabidopsis*. *BvFLC* undergoes a cold-induced downregulation which is reversed in leaves at ambient temperature while no variation is observed in the shoot apex (Reeves et al., 2006). In contrast, *AtFLC* expression in *Arabidopsis* is irreversibly inhibited by vernalization in both leaves and shoot apex (Sheldon et al., 2000; Searle et al., 2006). Our data showed that *BvFLC* mRNA accumulation is slightly increased in vernalized shoot apex, with a transient decrease only in genotypes that are susceptible to bolting stimuli. Profiling of DNA methylation within *BvFLC* coding region revealed a strong hyper-methylation in contrast with *AtFLC* that is only methylated on one cytosine in both vernalized and control plants and could not explain change in expression profile (Finnegan et al., 2005). A similar transient decrease was observed for *BvFWA*, but in all genotypes *BvFWA* mRNA accumulation was positively correlated with that of *BvFLC*, and negatively with *GMR*. In *Arabidopsis*, *AtFWA* expression was reported in leaves of some ecotypes, but it was not found in the shoot apex, and it was activated by drug-induced DNA hypo-methylation (Genger et al., 2003). *BvVIN3* showed a progressive and strong induction during vernalization, consistent with *AtVIN3* that is expressed only during cold exposure (Sung and Amasino, 2004). DNA methylation profiles of *BvVIN3* showed, for the first time to our knowledge, hyper-methylation during vernalization, with a polymorphism between R and S bolting genotypes. Furthermore, correlations were detected between mRNA accumulation of *BvVIN3* and the methylation statues of one of its cytosine and with *BvFLC* mRNA accumulation. Taken together, these data suggest that vernalization could induce *BvVIN3* mRNA accumulation through DNA methylation modifications and this in turn will contribute to the regulation of *BvFLC* in shoot apex. The mRNA accumulation of *BvVRN2* was shown to be slightly increased at the end of the vernalization treatment, whereas *AtVRN2* is not affected by cold (Schmitz and Amasino, 2007). Moreover, while the DNA methylation profile of *BvVRN2* is mainly unaffected by vernalization, it is able to discriminate between genotypes that are resistant or susceptible with respect to the bolting ability. *BvVRN2* mRNA accumulation was negatively correlated to the methylation of one cytosine position and positively correlated to the values of the Bolting Delay.

## **Conclusion**

Our study confirms the importance of comparing various plant model systems for the understanding of important developmental processes. We found many modifications of chromatin marks in cells from the shoot apex, depending on the genotype and treatment, independent of changes associated with ageing. We can report epigenetic modifications for both vernalization and devernalization: control of vernalization and devernalization seem to involve a common epigenetic pathway but with distinct modalities.

We propose that DNA hypo-methylation is necessary but not sufficient for bolting in sugar beet contrary to what is observed in *Arabidopsis* and that DNA hyper-methylation inhibits and delays bolting. Global histone H3 hypo-acetylation was only found in non-optimal bolting conditions suggesting a specific chromatin state in this situation. Furthermore, we found that the time course and amplitudes of the variations are critical for bolting induction and rapidity. This suggests that subsets of genes are successively up/down-regulated during the vernalization process allowing the vegetative meristem to undergo several determination steps until the floral state. Negative correlations were established between epigenetic parameters such as DNA methylation and histone H3 acetylation on the one hand and the percentage of vernalized plants that bolt on the other hand. Thus, genotypes with different bolting traits display distinct chromatin marks before, during and after treatments.

Although the *FLC*-like gene in sugar beet seems not to be directly regulated by DNA methylation as in *Arabidopsis*, the time course of mRNA accumulation in vernalized shoot apex is different between plants which are resistant and sensitive to bolting. Furthermore, bolting genes known to control *FLC* such as *VIN3* and *VRN2* are directly regulated by DNA methylation of transcribed regions during vernalization, with differences between resistant and sensitive bolting sugar beet genotypes. The mRNA accumulation of *BvFWA* was activated by DNA hypo-methylation. The extensive characterization of loci affected by global DNA methylation during vernalization and devernalization will help to clarify the role of the DNA methylation. This is of prominent importance now that the epigenetic marks imprinted on the genome are being localized through “epigenetic landscaping” techniques (Zhang et al., 2006). All these data open perspectives not only for sugar beet breeding but also for other vernalization-dependent plants such as cereals, by using epialleles in marker-assisted selection strategies for plant breeding (Gentil and Maury, 2007).

## Materials and Methods

### Plant material, growth conditions and treatments

Six to eighteen genotypes (named G1 to G18) of biennial sugar beet hybrids (*Beta vulgaris altissima*, provided by SESVanderHave, Belgium) were selected for their distinct bolting characteristics. Seeds were germinated and grown in a chamber for eight weeks at 22°C under a 16 h photoperiod (700  $\mu\text{M m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Then, six different thermal and/or chemical treatments were performed (Table S1):

- control treatment at 22°C during 0, 6, 12 or 18 weeks,
- cold treatment at 7°C (vernalization) during 0, 6, 12, or 18 weeks,
- cold treatment at 4°C (vernalization) during 0, 3, 6, 9, 12, 15 or 18 weeks,
- cold treatment at 4°C (vernalization) during 0, 3, 6, 9, 12, 15 or 18 weeks followed by one week at 26°C (devernalization),
- control treatment at 22°C during 0, 6, 12 or 18 weeks with DNA hypo-methylating by addition of 5-azacytidine (Sigma, Germany) every 6 weeks since germination. 5-Azacytidine (250  $\mu\text{M}$ ) was diluted in the water for irrigation,
- cold treatment at 7°C (vernalization) during 0, 6, 12, or 18 weeks with DNA hyper-methylating treatment by addition of hydroxyurea (Sigma) every 6 weeks since germination. Hydroxyurea (250  $\mu\text{M}$ ) was diluted in the water for irrigation.

All treatments were performed on six genotypes (G1 to G6). Cold treatment at 4°C (vernalization) was repeated on twelve other genotypes (G7 to G18). For each genotype and treatment duration, 24 plants were sampled as follows: shoot apices of 14 plants were immediately collected, cleared from differentiated tissues and frozen in liquid nitrogen (Fig. S3). The 10 remaining plants were placed six weeks at 22°C under light conditions optimal for bolting (1000  $\mu\text{M m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ; Table S1). During this period, two bolting parameters *i.e.* bolting index (BI) and bolting delay (BD) were monitored daily. BI is the percentage of bolting plants and BD is the average number of days required for a visible bolting initiation. DBI was defined by the difference between BI of cold treatment at 4°C (vernalization) and BI of cold treatment at 4°C (vernalization) followed by one week at 26°C (devernalization). At the end of the six weeks, shoot apices of the bolting plants were collected as previously described. The approximately eight thousand shoot apices were stored at -80°C until used.



### **Determination of DNA methylation percentages by HPLC**

Genomic DNA was purified from sugar beet apex using an already published phenol/chloroform extraction, ribonucleaseA digestion and ethanol precipitation (Causevic et al., 2005). Global genomic DNA methylation percentage was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) after the enzymatic hydrolysis of DNA into nucleosides (Causevic et al., 2005). The digested DNA was injected onto a Gemini column (C18, 4.6 mm x 15 cm, 5 µm, Phenomenex, France). The column was eluted at 1.5 ml min<sup>-1</sup> during 30 min with an isocratic mobile phase of water/methanol (199/1, v/v) supplemented with 0.3% acetic acid (v/v). Cytosine and methylcytosine were identified and quantified according to their retention time and spectral properties compared to a calibration curves of commercial standards (Sigma). The methylcytosine percentages (%mC) were calculated using the following formula:  $\%mC = (mC / (C + mC)) \times 100$ , with cytosine (C) and methylcytosine (mC) quantities respectively. Two independent analyses and three replicates were performed for each measurement.

### **Determination of DNMT and HDAC enzymatic activities**

The extraction and measurement of enzymatic activity of DNA methyltransferase (DNMT, EC 2.1.37) were performed as described previously by Causevic et al., (2005). DNMT activities are expressed in pkat mg<sup>-1</sup> protein. Histone deacetylase (HDAC, EC 3.5.1) extraction and enzymatic activity were performed using MAL, an artificial substrate, according to Causevic et al., (2006). The HDAC activity is measured by the percentage of MAL deacetylation. Protein concentration was determined with the Protein Assay Dye Reagent according to manufacturer's recommendations (Bio-Rad, France). Bovine serum albumin (0-33 µg µl<sup>-1</sup>) was used as a standard reference.

### **Detection of DNMT and HDAC isoforms by immunoblotting**

DNMT and HDAC immunodetections were performed according to Causevic et al., (2005) and Causevic et al., (2006) respectively. Sugar beet protein extracts were immunodetected using carrot anti-DNMT1 antibodies at 1:1000 dilutions (v/v) or using maize anti-HDAC antibodies. HDAC antibodies, raised against the different maize HDAC isoforms, were used at the following dilutions: HD1A at 1: 1 000 dilution (v/v); HD1BI antibodies at 1: 1 000 dilution (v/v) and HD2 antibodies at 1: 3 000 dilution (v/v). A carrot DNMT1 and maize HD1A recombinant proteins, along with prestained SDS-PAGE standards low range marker (Bio-rad) were used to identify the corresponding isoforms. After developing with 5-

bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium liquid substrate (Sigma), the blots were scanned and the bands quantified using imaging software (ImageTool for Windows version 3.00).

### **Determination by immunoblotting of chromatin global histone H<sub>3</sub> acetylation ratio**

Histones were isolated and purified from sugar beet apex as described previously in Causevic et al., (2006). Similar amounts of histone extracts were loaded on SDS-PAGE gels. A histone H<sub>3</sub> enriched preparation from calf thymus (arginine-rich subgroup f<sub>3</sub>; Sigma) was used as standard. Immunodetection was performed with human anti-H<sub>3</sub> histone, human anti-acetylated H<sub>3</sub> histone polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology, USA) at 1: 1 000 dilutions (v/v) and confirmed using anti-acetylated lysine antibodies (Cell signaling, USA) at 1: 1 000 dilutions (v/v). The histone acetylation ratio of histone H<sub>3</sub> ( $R_{acH3}$ ) corresponds to the ratio between amounts of detected acetylated H<sub>3</sub> and non-acetylated H<sub>3</sub> histones respectively.

### **Bioinformatics identification of sugar beet homologous genes**

Using TBLASTX, homologous sequences to the *Arabidopsis* genes involved in the vernalization pathway, *VIN3*, *VRN2* and *FWA* respectively (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>), were identified in the sugar beet EST databases (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/Blast/index.cgi>). E-values for *BvVIN3* (BQ593505), *BvVRN2* (BQ487825), *BvFWA* (BQ488890) were of  $1.2 \times 10^{-23}$ ,  $2.0 \times 10^{-19}$  and  $3.6 \times 10^{-28}$  respectively. The *BvFLC* sequence ([DQ189215](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/DQ189215)) corresponding to a *FLC*-like gene in sugar beet has already been reported in Reeves et al (2006).

### **Bisulfite treatment and conversion efficiency**

Treatment of genomic DNA with bisulfite deaminates unmethylated cytosine residues (Cs) to uracils (Us), which are recognized as thymines (Ts) in subsequent PCR amplification and sequencing. 5-methylcytosine residues (mCs) remain unchanged by this treatment and are therefore detected as cytosines. This method allows direct and positive determination of methylation sites. Epitect bisulfite kit (Qiagen, USA) and 500 ng of genomic DNA were used according to manufacturer's recommendations.

Two controls were performed to test bisulfite conversion efficiency. First, a Universal Methylated DNA Standard (Zymo research) was used. This standard is a DNA sequence of pUC19, which contains enzymatically methylated Cs in CG context, whereas all the others Cs are unmethylated. After sequencing, optimal bisulfite conversion (about 99%) was confirmed

by substitution of all Cs at CG sites by Ts. Conversion of cytosine in plant genomic DNA was evaluated using HPLC analysis as previously mentioned. The conversion percentage was found to be around 80%, which was taken in consideration for further interpretations.

### **PCR amplification for methylation analysis**

The selection of regions for methylation analysis was directed by the search of C rich sequence using CpG island searcher web site (<http://www.cpgislands.com/>). In order to minimize mismatches due to bisulfite conversions at 3'<sub>OH</sub> extremity, degenerated nucleotide Y (where Y = C, T) and R (where R = G, A) were used in the forward and reverse primers respectively. Primers were tailed with M13 forward 5'TGTAAAACGACGGCCAGT3' or M13 reverse 5'CAGGAAACAGCTATGACC3' were designed with EPrimer3 software (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/MobylyePortal/portal.py?form=eprimer3>) and verified using Net Primer software (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html#>). Addition of M13 tails to the primers allows a direct sequencing of the PCR product without any cloning step. Sequences of primers for *BvVIN3*, *BvVRN2* and *BvFWA* were respectively: 5'CCAGAATGAGCAAGGAGGAY3' and 5'TTCCCACAAGAATGCGATA3' or 5'CAGGATGAAGATCGCAAT3' and 5'TGATGCCGAAATGATAAAACC3' or 5'AAGGTTACATGGGTGGAGYA3' and 5'TTGTTTCGTCATCCTTTGTRC3'. Gradient PCR were first done to determine the optimal temperature for primer annealing. Then, PCR amplification was realized using HotStar Taq<sup>®</sup> enzyme (Qiagen) and the following protocol to optimize specific amplification: 30 ng DNA, 1× Q buffer (Qiagen), 1× Coral buffer (Qiagen), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dNTP, 0.2 μM of each primer, 0.5 U of HotStar Taq DNA polymerase. 95°C for 15 min, 40 cycles of 94°C for 30 sec, T<sub>m</sub> for 1 min, 72°C for 1 min, then 72°C for 10 min. PCR products were then purified using a Mini Elute PCR purification kit (Qiagen). Methylation profiles analyses were performed on two sensitive genotypes (G7 and G8) and two resistant genotypes (G12 and G13). Genotypes G7, G8, G12 and G13 display a BI of 92%, 64%, 3% and 8%, and a BD of 29, 30, 32 and 36 days, respectively.

### **Sequencing and analysis**

M13-tailed PCR products were sequenced using BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 kit protocol with M13 primers sequences described above. Products were purified on Centri-Sep<sup>®</sup> columns (Applied Biosystems, USA) according to the manufacturer's protocols and

sequenced on an automated DNA sequencer ABI 3100 (Applied Biosystems). Electrophoregrams were analyzed with BioEdit software. For each cytosine position, the height of cytosine and thymine peaks were estimated, corrected with the conversion percentage and used to calculate the methylation percentage. Three replicates were performed for each sequence.

### **Bisulfite sequencing verification**

Methylsensitive PCR (MSPCR) was performed using the isoschizomers *Hpa* II and *Msp* I to digest genomic DNA. Both enzymes recognize the sequence -C<sup>1</sup>C<sup>2</sup>GG-. *Hpa* II is inhibited when a single C or both are methylated, whereas *Msp* I activity is blocked only when C<sup>1</sup> is methylated. After ethanol precipitation, digested or undigested genomic DNA was amplified by PCR as described above using specific primers without M13 tail. PCR products were separated in an 8% polyacrylamide gel and revealed under UV by ethidium bromide staining.

### **Semi-quantitative RT-PCR analysis**

Total RNAs were isolated using Nucleospin® RNA Plant (Macherey-Nagel, France). RNAs were extracted from two sensitive genotypes (G7 and G8) and two resistant genotypes (G12 and G13). Genotypes G7, G8, G12 and G13 display a BI of 92%, 64%, 3% and 8%, and a BD of 29, 30, 32 and 36 days, respectively. Approximately 500 ng of total RNA were reverse transcribed using High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). Primers are identical to those designed for bisulfite sequencing but without the M13 tails. Constitutively expressed *TUBULIN* and *UBIQUITIN* genes were used as internal standards to normalize the amount of mRNA in PCR reaction. The number of PCR cycles was adjusted to avoid reaching saturation. Aliquots of the PCR reaction separated by electrophoresis in an 8% polyacrylamide gel and observed under UV after ethidium bromide staining. Bands were quantified with imaging software (ImageTool for Windows version 3.00).

### **Statistical analysis**

Statistical analyses were performed using the SPSS statistical software package (SPSS version 11.0.1 PC, Chicago, IL, USA). Means are expressed with their standard error and compared by ANOVA (GLM procedure). All statistical tests were considered as significant at \*  $P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$  or \*\*\*  $P \leq 0.001$ .

Relationships between levels of bolting parameters (BI, BD) and levels of epigenetic parameters (methylcytosine percentage, DNMT activity, histone H3 acetylation ratio and HDAC activities) during vernalization and devernalization treatment were computed by linear correlation (Pearson's coefficient,  $r$ ) and illustrated by a principal component analysis (PCA). The variables were standardized, and orthogonal factors (= F1 and F2 axis) were successively built as linear combinations of these variables to maximize the proportion of the variability explained by these factors. The bolting variables (BI and BD) of vernalized and devernalized plants were projected as supplementary variables in their F1×F2 corresponding plane. Their coordinates corresponded to their linear correlation coefficients with scores of F1 and F2 axis of the PCA.

### **Acknowledgements**

This work and a Ph-D grant (M-V. Trap-Gentil) were supported by SES-VanderHave, Belgium and the Conseil Régional de la Région Centre, France. The authors would like to acknowledge Jean-Paul Charpentier, Marie-Claude Lesage-Descauses, Emmanuelle Magnoux and Nathalie Noël-Boizot from INRA, Orléans for their technical help. The authors are grateful to Dr. Rino Cella, University of Pavia, and to Prof. P. Loidl and WA El-Soud, Innsbruck Medical University for providing respectively carrot-DNMT1 antibodies and maize-HDAC antibodies with the corresponding recombinant proteins. We also thank Carole Latruwe, Gilles Moreau, Adisa Causevic and Mourad Kamiri for technical assistance. We are grateful to Estelle Jaligot from CIRAD Montpellier (France) and Pierre Devaux from Florimond-Desprez (France) for the careful reading of the manuscript.

## Literature cited

- Bastow R, Mylne JS, Lister C, Lippman Z, Martienssen RS, Dean C** (2004) Vernalization requires epigenetic silencing of *FLC* by histones methylation. *Nature* **427**: 164-167
- Berdasco M, Alcazar R, Garcia-Ortiz M, Ballestar E, Fernandez A, Roldan-Arjona T, Tiburcio A, Altabella T, Buisine N, Quesneville H, Baudri A, Lepiniec L, Alamonos M, Rodriguez R, Lloyd A, Colot V, Bender J, Canal M, Esteller M, Fraga M** (2008) Promoter DNA hypermethylation and gene repression in undifferentiated *Arabidopsis* cells. *PLOS one* **3**: e3306
- Brock R, Davidson J** (1994) 5-Azacytidine and gamma-rays partially substitute for cold treatment in vernalizing winter-wheat. *Environ Exp Bot* **34**: 195-199
- Burn JE, Bagnall DJ, Metzger JD, Dennis ES, Peacock WJ** (1993) DNA methylation, vernalization and initiation of flowering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **90**: 287-291
- Causevic A, Delauney A, Ounnar S, Righezza M, Delmotte F, Brignolas F, Hagège D, Maury S** (2005) DNA methylating and demethylating treatments modify phenotype and cell wall differentiation state in sugar beet cell lines. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**: 681-691
- Causevic A, Gentil M-V, Delauney A, El-Soud WA, Garcia Z, Pannetier C, Brignolas F, Hagège D, and Maury S** (2006) Relationship between DNA Methylation and Histone Acetylation Levels, Cell Redox and Cell Differentiation States in Sugar beet Lines. *Planta* **224**: 812-827
- Chouard P** (1960) Vernalization and its relations to dormancy. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **11**: 191-238
- Deng W, Liu C, Pei Y, Deng X, Niu L, Cao X** (2007) Involvement of the histone acetyltransferase AtHAC1 in the regulation of flowering time via repression of *FLC* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **143**: 1660-1668
- Dennis ES, Peacock W** (2007) Epigenetic regulation of flowering. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 520-527
- Fieldes MA, Schaeffer SM, Krech MJ, Brown JCL** (2005) DNA hypomethylation in 5-azacytidine-induced early-flowering lines of flax. *Theor. Appl. Genet* **111**: 136-149
- Finnegan E, Genger R, Kovac K, Peacock W, Dennis E** (1998) DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 5824-5829

- Finnegan EJ, Kovac KA** (2000) Plant DNA methyltransferases. *Plant Molecular Biology* **43**: 189-201
- Finnegan EJ, Kovac KA, Jaligot E, Sheldon CC, Peacock WJ, Dennis ES** (2005) The downregulation of *FLOWERING LOCUS C (FLC)* expression in plants with low levels of DNA methylation and by vernalization occurs by distinct mechanisms. *The Plant Journal* **44**: 420-432
- Finnegan EJ, Dennis ES** (2007) Vernalization-induced trimethylation of histone H3 lysine 27 at *FLC* is not maintained in mitotically quiescent cells. *Current Biology*
- Fraga M, Rodriguez R, Canal M** (2002) Genomic DNA methylation-demethylation during aging and reinvigoration of *Pinus radiata*. *Tree Physiology* **22**: 813-816
- Fu W, Wu K, Duan J** (2007) Sequence and expression analysis of histone deacetylase in rice. *Biochem Biophys Res Commun* **356**: 843-850
- Genger R, Peacock WJ, Dennis ES, Finnegan EJ** (2003) Opposing effects of reduced DNA methylation on flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **216**: 461-466
- Gentil M-V, Maury S** (2007) Characterization of epigenetic biomarkers using new molecular approaches. In R Varshney, R Tuberosa, eds, *Genomic assisted crop improvement*, Vol Vol 1: Genomic approaches and platforms. Springer, pp 351-370
- Kim H, Hyun Y, Park J, Park M, Park M, Kim M, Kim H, Lee M, Moon J, Kim J** (2004) A genetic link between cold responses and flowering time through *FVE* in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetic* **36**: 111-112
- Kondo H, Miura T, Wada K, Takeno K** (2007) Induction of flowering by 5-azacytidine in some plant species: relationship between the stability of photoperiodically induced flowering and flower-inducing effect of DNA demethylation. *Physiologia Plantarum* **131**: 462-469
- Koornneef M, Alonso-Blanco C, Peeters A, Soppe W** (1998) Genetic control of flowering time in *Arabidopsis*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* **49**: 345-370
- Lang A** (1965) Physiology of flower initiation. In *Encyclopedia of Plant Physiology* (ed. W. Ruhland), Springer-Verlag, Berlin, pp 1371-1531
- Law RD, Suttle JC** (2005) Chromatin remodeling in plant cell culture: patterns of DNA methylation and histone H3 and H4 acetylation vary during growth of asynchronous potato cell suspensions. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**: 527-534
- Lexander K** (1980) Present knowledge of sugar bolting mechanisms. In 43rd Winter Congress, Inst. Int. Rech. Betterav., Bruxelles, pp 245-258
- Loidl P** (2004) A plant dialect of the histone language. *Trends in Plant Science* **9**: 84-90



- Lukens LN, Zhan S** (2007) The plant genome's methylation status and response to stress: implications for plant improvement. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 317-322
- Metzger JD** (1988) Localization of the site of perception of thermoinductive temperatures in *Thlaspi arvense* L. *Plant Physiology* **86**: 237-240
- Mutasa-Gottgens E, Qi A, Mathews A, Thomas S, Phillips A, Hedden P** (2008) Modification of gibberellin signalling (metabolism & signal transduction) in sugar beet: analysis of potential targets for crop improvement. *Transgenic Research* DOI 10.1007/s11248-008-9211-6
- Perarnaud V, Souverain F, Prats S, Dequiet B, Fauchère J, Richard-Molard M** (2001) Influence du climat sur le phénomène de montée à graine de la betterave. Synthèse. In. ITB-Météo-France, <http://www.institut-betterave.asso.fr>.
- Pipal A, Goralik-Schramel M, Lusser A, Lanzanova C, Sarg B, Loidl A, Lindner H, Rossi V, Loidl P** (2003) Regulation and processing of histone maize histone deacetylase Hda by limited proteolysis. *Plant Cell* **15**: 1904-1917
- Porter J, Semenov M** (2005) Cross response to climatic variation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **360**: 2021-2035
- Purvis ON, Gregory FG** (1952) Studies in vernalization of cereals. XII. The reversibility by high temperature of the vernalized condition in Petkus winter rye. *Annals of Botany* **1**: 569-592
- Reeves PA, He Y, Schmitz RJ, Amasino RM, Panella LW, Richards CM** (2006) Evolutionary conservation of the *FLC*-mediated vernalization response: evidence from the sugar beet (*Beta vulgaris*). *Genetics* **176**: 295-307
- Schmitz RJ, Amasino RM** (2007) Vernalization: a model for investigating and eukaryotic gene regulation in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* **1769**: 269-275
- Searle I, He Y, Turck F, Vincent C, Fornara F, Kröber S, Amasino RA, Coupland G** (2006) The transcription factor *FLC* confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes & Development* **20**: 898-912
- Sha A, Lin X, Huang J, Zhang D** (2005) Analysis of DNA methylation related to rice adult plant resistance to bacterial blight based on methylation-sensitive AFLP (MSAP) analysis. *Molecular Genetics and Genomics* **273**: 484-490
- Sheldon C, Rouse D, Finnegan E, Peacock W, Dennis E** (2000) The molecular basis of vernalization: the central role of *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*). *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 3753-3758

- Sherman J, Talbert L** (2002) Vernalization-induced changes of the DNA methylation pattern in winter wheat. *Genome* **45**: 253-260
- Smit A** (1983) Influence of external factors on growth and development of sugar-beet (*Beta vulgaris* L.). In. Agricultural Research Reports, PUDOC
- Steward N, Kusano T, Sano H** (2000) Expression of *ZmMET1*, a gene encoding a DNA methyltransferase from maize, is associated not only with DNA replication in actively proliferating cells, but also with altered DNA methylation status in cold-stressed quiescent cells. *Nucleic Acids Research* **28**: 3250-3259
- Steward N, Ito M, Yamaguchi Y, Koizumi N, Sano H** (2002) Periodic DNA methylation in maize nucleosomes and demethylation by environmental stress. *The Journal of Biochemical Chemistry* **40**: 37741-37746
- Sung S, Amasino RM** (2004) Vernalization in *Arabidopsis thaliana* is mediated by the PHD finger protein VIN3. *Nature* **427**: 159-164
- Teyssier E, Bernacchia G, Maury S, How kit A, Stammitti-Bert L, Rolin D, Gallusci P** (2008) Tissue dependent variations of DNA methylation and endoreduplication levels during tomato fruit development and ripening. *Planta* **228**: 391-399
- Thomas B, Adams S, Collier R, Fellows J, Jenner C, Jaggard K, Qi A, Semenov M, A W** (2008) AC0301: vulnerability of UK agriculture to extreme events. In. UK Department for Environment Food and Rural Affairs (DEFRA), p 12 [http://www.defra.gov.uk/science/project\\_data/documentlibrary/AC0301/AC0301\\_6900\\_IR.doc](http://www.defra.gov.uk/science/project_data/documentlibrary/AC0301/AC0301_6900_IR.doc)
- Tsuji H, Saika H, Tsutsumi N, Hirai A, Nakazono M** (2006) Dynamic and reversible changes in histone H3-Lys4 methylation and H3 acetylation occurring at submergence-inducible genes in rice. *Plant Cell Physiology* **47**: 995-1003
- Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, Cokus S, Chan SW-L, Chen H, Henderson I, Shinn P, Pellegrini M, Jacobsen S, Ecker J** (2006) Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell* **126**: 1189–1201

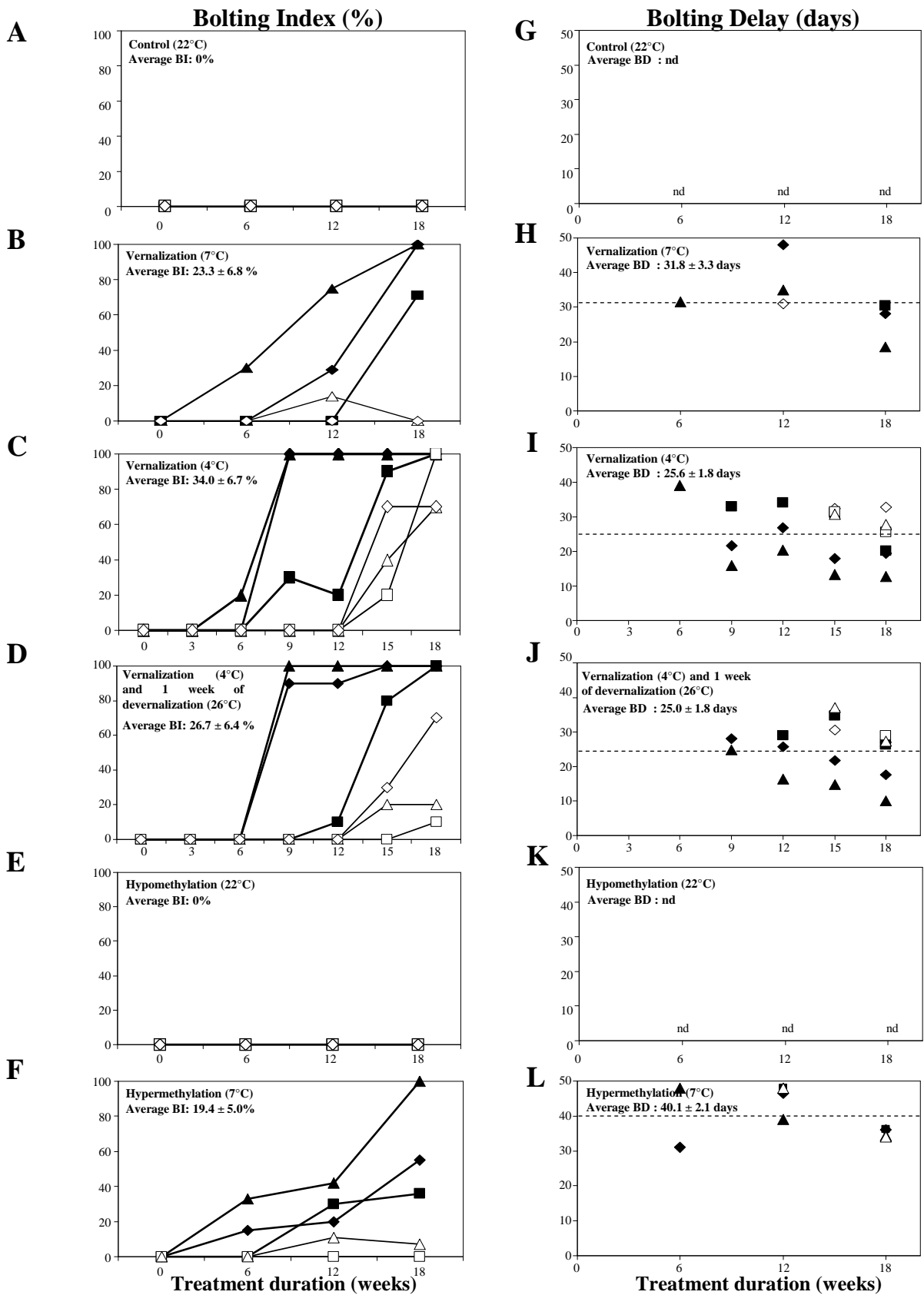
## Tables

**Table I.** Linear correlations (Pearson's coefficients,  $r$ ) between mean values (all genotypes and durations,  $n = 42$ ) of methylcytosine percentage (%mC), DNA Methyltransferase activity (DNMT), histone H<sub>3</sub> acetylation ratio (R<sub>AcH3</sub>), Histone deacetylase activity (HDAC), bolting delay (BD), bolting index (BI), DBI that is defined by the difference between BI of cold treatment at 4°C (vernalization) and BI of cold treatment at 4°C (vernalization) followed by one week at 26°C (devernalization) and F1 and F2 axes of PCAs. Correlations were computed at genotype level from six sugar beet hybrids treated 0, 3, 6, 9, 12, 15 or 18 weeks at 4°C (vernalized plants, upper case) or followed by one week at 26°C (devernalized plants; lower case in italic). Significant correlations are indicated by asterisk: \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ .

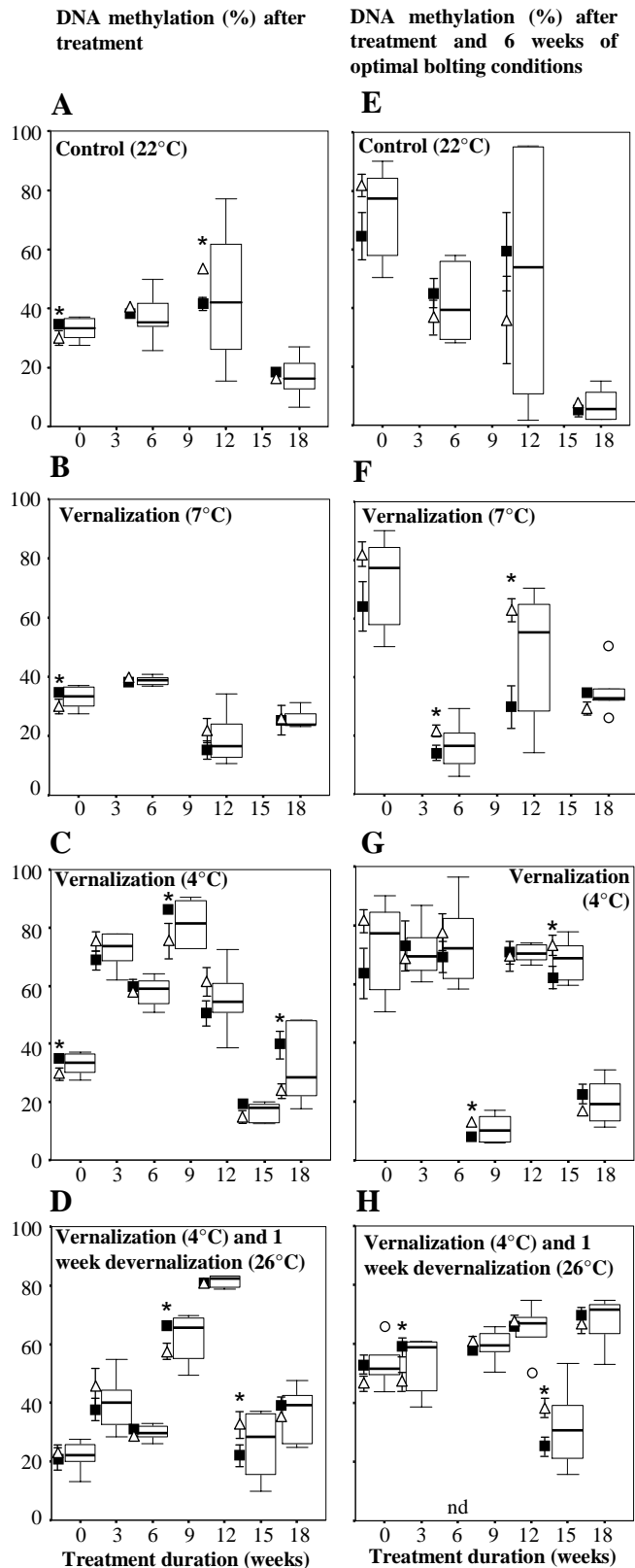
Variables	BI	BD	DBI
%mC	-0.51***		0.34* <i>0.34*</i>
DNMT	-0.39*		
R <sub>AcH3</sub>	-0.34*		
HDAC	-0.42**		
BI			-0.33*
BD	-0.81*** <i>-0.60*</i>		-0.44* <i>-0.56*</i>
F1 axis of PCA	-0.43** <i>-0.35*</i>		
F2 axis of PCA	-0.34*		
		-0.50*	

**Table II.** Linear correlations (Pearson's coefficients,  $r$ ) between mean values (all genotypes and durations,  $n = 12$ ) mRNA accumulation levels of the vernalization genes *BvFLCa*, *BvFLCb*, *BvVIN3*, *BvVRN2*, *BvFWA*, global genomic DNA methylation percentage (Global genomic %mC), methylation percentage in a cytosine context of vernalization genes (CG, CNG and asymmetric CHH), methylation percentage of one cytosine of vernalization genes, Bolting Delay (BD) and Bolting Index (BI). Correlations were computed at genotype level from six sugar beet hybrids treated 0, 3, 6, 9, 12, 15 or 18 weeks at 4°C (vernalized plants). Significant correlations are indicated by asterisk: \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ .

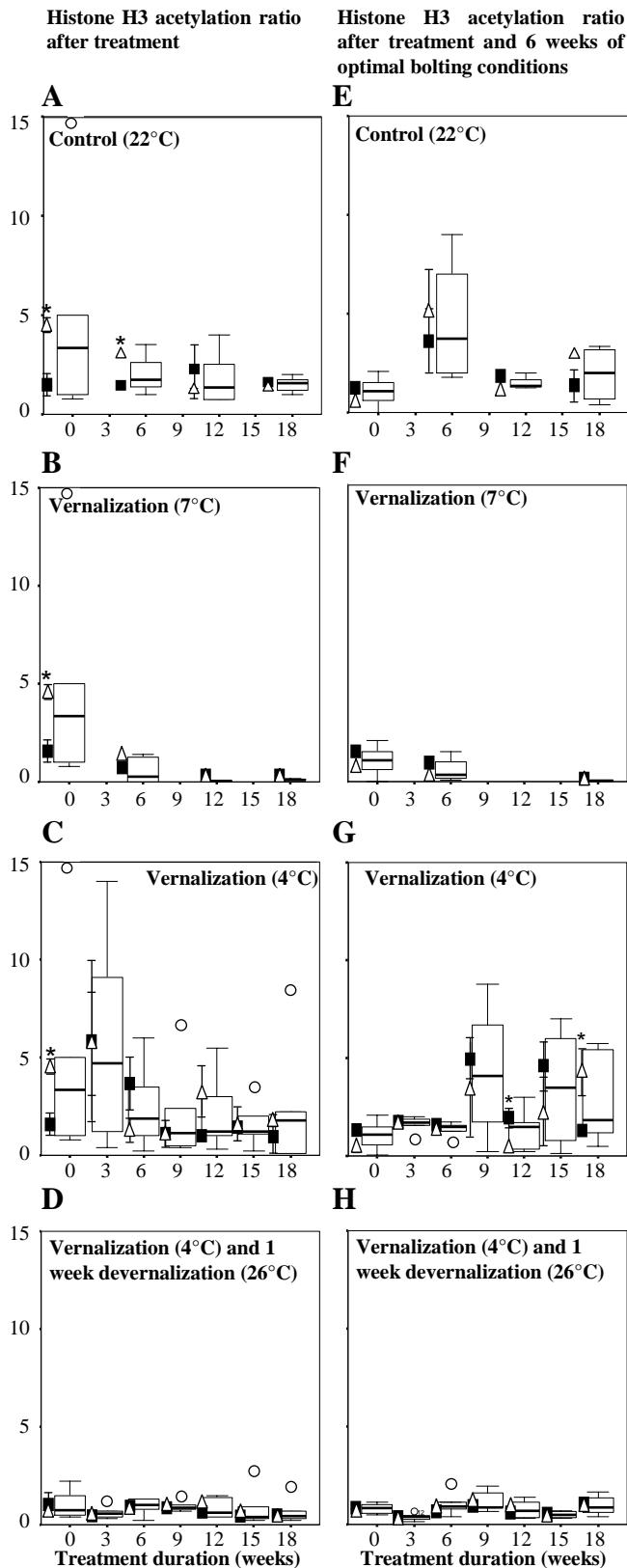
		mRNA accumulation levels				
		<i>BvFLC</i>		<i>BvVIN3</i>	<i>BvVRN2</i>	<i>BvFWA</i>
		<i>a</i>	<i>b</i>			
mRNA accumulation levels	<i>BvFLCb</i>	0.67*		0.72*		
	<i>BvVIN3</i>	0.66*	0.72*		0.60*	
	<i>BvVRN2</i>			0.60*		
	<i>BvFWA</i>	0.73*				
GMR						-0.73*
Methylation percentage in context	CG	0.89*				
	CNG				0.97*	
	Asymmetric CHH		0.95*			
Methylation percentage of one cytosine	<i>BvVIN3</i> C4			0.96***		
	<i>BvVRN2</i> C24					-0.99***
Bolting variables	BI					
	BD					0.75***



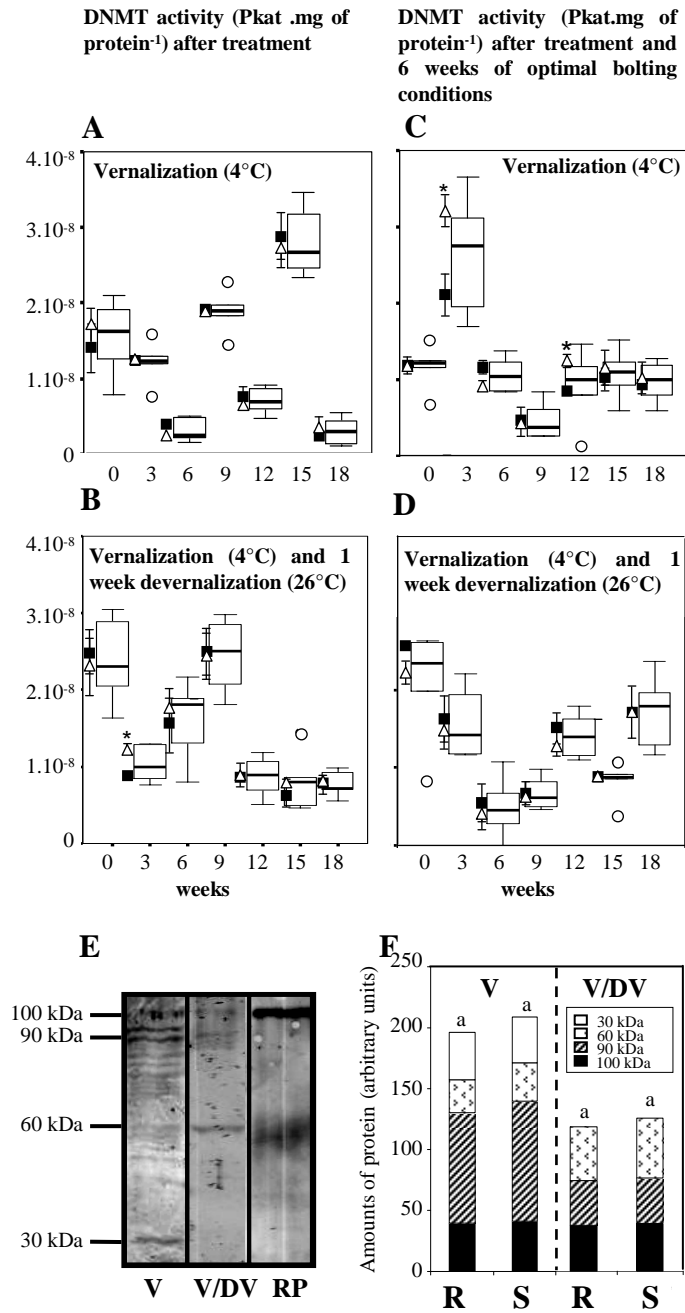
**Figure 1.** Characterization of sugar beet bolting sensitivity traits. Follow-up of bolting index (BI) corresponding to the percentage of bolting plants on the left and bolting delay (BD) corresponding to the average numbers of days required for bolting on the right, during optimal bolting period for the six genotypes G1 (▲), G2 (◆), G3 (■), G4 (△), G5 (◇) and G6 (□) after 0, 3, 6, 9, 12, 15 or 18 weeks at 22°C for control treatment (A and G), at 7°C (B and H) or 4°C (C and I) for vernalization treatments, at 4°C followed each time by one week at 26°C for devernialization treatment (D and J), at 22°C with addition of DNA hypo-methylating agent for hypo-methylating treatment (E and K), at 7°C with addition of DNA hyper-methylating agent for hyper-methylating treatment (F and L). Average BD is indicated by the dotted line. nd: not determined



**Figure 2.** Genetic variation of global genomic DNA methylation percentage at different treatment durations (0, 3, 6, 9, 12, 15 and 18 weeks) in shoot apex of six sugar beet hybrids. Box plots are shown for global genomic DNA methylation percentage measured immediately after treatments (A to D) or six weeks after optimal bolting conditions (E to H). Four distinct treatments were realized: A and E, control (22°C); B and F, vernalization (7°C); C and G, vernalization (4°C); D and H, vernalization (4°C) followed by devernialization one week (26°C). Each box represents the quartile below (Q1) and above (Q3) the median value. Vertical bars show minimum and maximum values except for genotypes away from 1.5 times from the top of the inter-quartile (Q3 - Q1) range. Values outside this range are represented by open circles. Means of global genomic DNA methylation percentages at each treatment duration for bolting sensitive genotypes G1, G2 and G3 (filled square) and for bolting resistant genotypes G4, G5 and G6 (open triangle) are indicated on the left of each corresponding box plot. Means are accompanied by their standard errors SE (n = 6). Significant differences between bolting resistant and sensitive genotypes are indicated by asterisk: \*  $P \leq 0.05$ . nd: not determined.

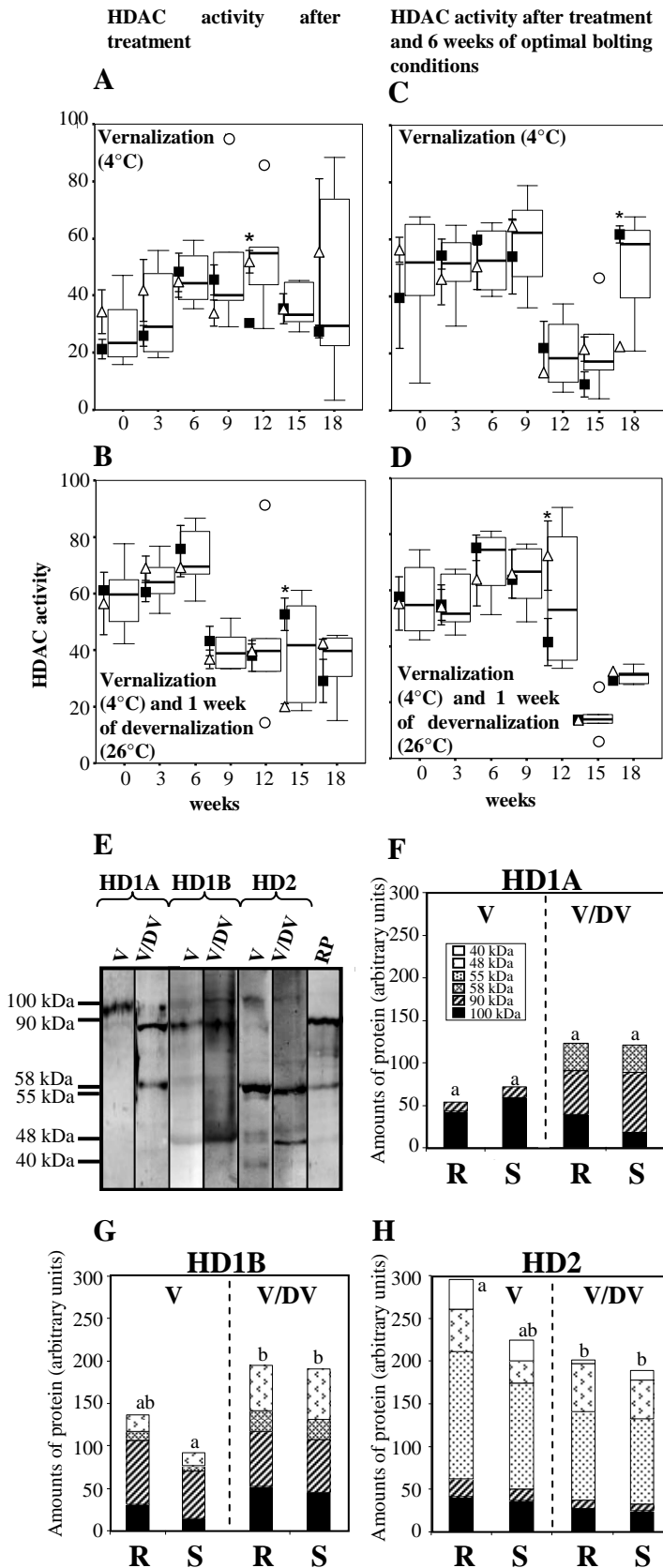


**Figure 3.** Genetic variation of global histone H3 acetylation ratio at different treatment durations (0, 3, 6, 9, 12, 15 and 18 weeks) in shoot apex of six sugar beet hybrids. Box plots are shown for variations of %mC global histone H3 acetylation ratio measured immediately after treatments (A to D) or six weeks after optimal bolting conditions (E to H). Four distinct treatments were realized: A and E, control (22°C); B and F, vernalization (7°C); C and G, vernalization (4°C); D and H, vernalization (4°C) followed by devernialization one week (26°C). Each box represents the quartile below (Q1) and above (Q3) the median value. Vertical bars show minimum and maximum values except for genotypes away from 1.5 times from the top of the inter-quartile (Q3 - Q1) range. Values outside this range are represented by open circles. Means of global histone H3 acetylation ratio at each treatment duration for bolting sensitive genotypes G1, G2 and G3 (filled square) and for bolting resistant genotypes G4, G5 and G6 (open triangle) are indicated on the left of each corresponding box plot. Means are accompanied by their standard errors SE (n = 6). Significant differences between bolting resistant and sensitive genotypes are indicated by asterisk: \*  $P \leq 0.05$ .

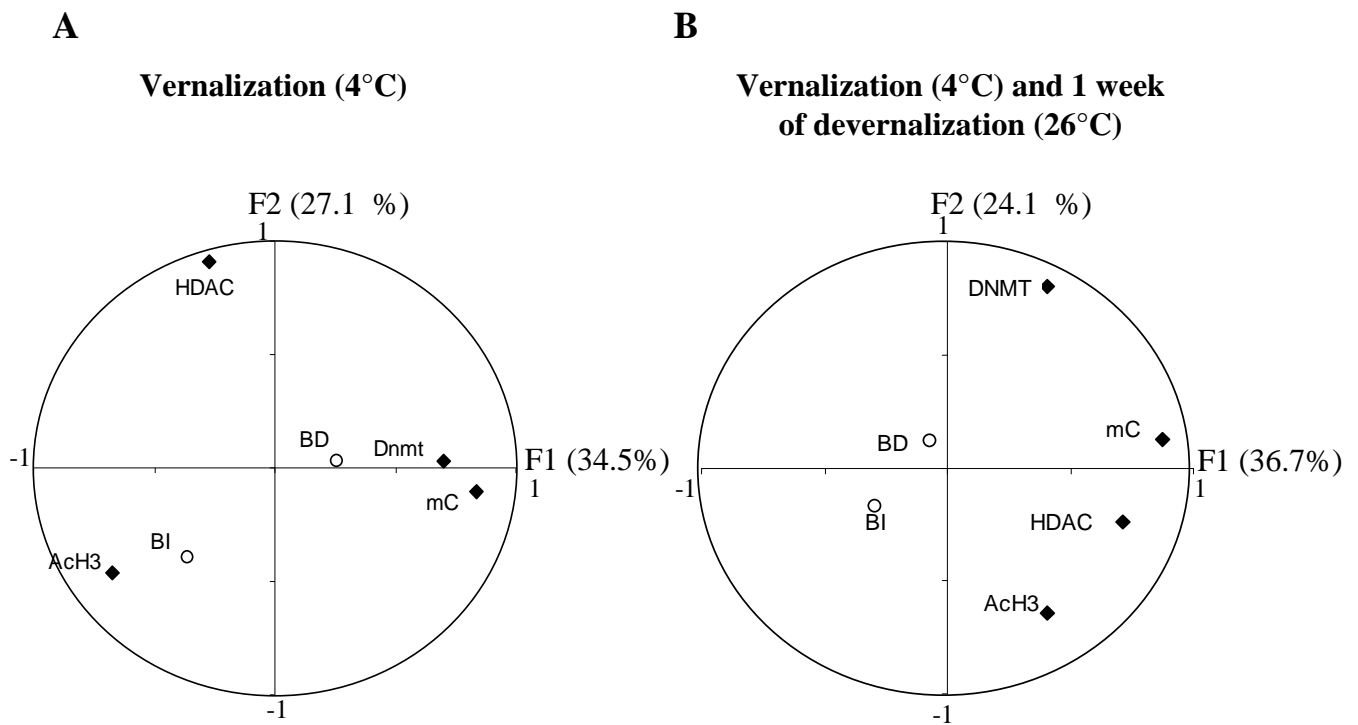


**Figure 4.** Analysis of genetic variation of DNA methyltransferase (DNMT) activity and isoforms accumulation in sugar beet during vernalization and devernalization. Box plots show genetic variations of DNMT activity recorded in 6 genotypes during 0 to 18 weeks: (A) at 4°C for vernalization treatment, (B) at 4°C followed by one week at 26°C for devernalization treatment. For each treatment duration, a share of plants were placed 6 additional weeks under optimal bolting conditions. (C) Genetic variation of DNMT activity in vernalized and (D) devernalized plants after bolting treatment. resistant and sensitive genotypes. The mean of bolting resistant and sensitive genotypes is indicated by open triangle and filled square respectively and meaning differences are indicating with \*  $P \leq 0.05$ . (E) Western blots with carrot-DNMT1 antibodies raised against proteins separated by SDS-PAGE extracted from shoot apex of 15 weeks vernalized at 4°C (V) and devernalized at 26°C (V/DV) sugar beet and from the carrot-DNMT1 recombinant protein (RP). (F) Accumulation of different DNMT isoforms detected by carrot-DNMT1 antibodies from 15 weeks vernalized and devernalized sugarbeet. Detected bands are indicated with (□) for 30 kDa band, (▤) for 60 kDa band, (▨) for 90 kDa band and (■) for 100 kDa band. Values marked with different letters are significantly different ( $*P \leq 0.05$ ).

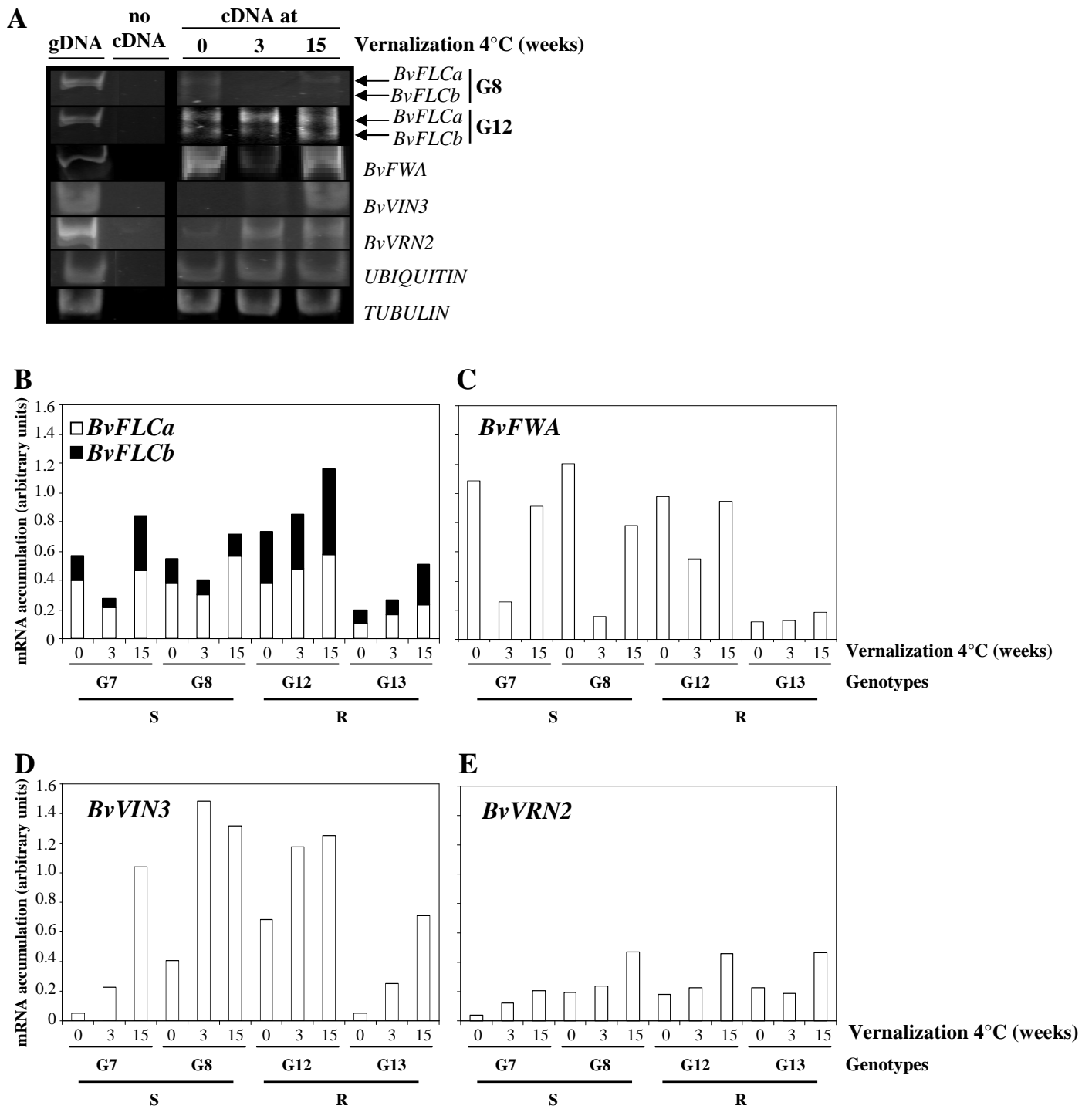




**Figure 5 .** Analysis of histone deacetylase (HDAC) in sugar beet during vernalization and devernalization. Box plots show genetic variations of HDAC activity recorded in 6 genotypes during 0 to 18 weeks: (A) at 4°C for vernalization treatment, (B) at 4°C followed by one week at 26°C for devernalization treatment. For each treatment duration, a share of plants were placed 6 additional weeks under optimal bolting conditions. (C) Genetic variation of DNMT activity in vernalized and (D) devernalized plants after bolting treatment. resistant and sensitive genotypes. The mean of bolting resistant and sensitive genotypes is indicated by open triangle and filled square respectively and meaning differences are indicating with \*  $P \leq 0.05$ . (E) Western blots with antibodies raised against (from left to right): the maize HD1A, the maize HD1B and the maize HD2 proteins. Proteins separated by SDS-PAGE were prepared from shoot apex of 15 weeks vernalized at 4°C (V) and devernalized at 26°C (V/DV) sugar beet and from the maize-HD1A recombinant protein (RP). Sizes of detected bands are indicated in kDa. Accumulation of different isoforms detected with (F) maize-HD1A, (G) maize-HD1B and (H) maize-HD2A antibodies from resistant (R) and sensitive (S) genotypes after 15 weeks of vernalization at 4°C (V) or devernalization at 26°C (V/DV). Detected bands are indicated with (□) for 40 kDa band, (▤) for 48 kDa band, (▥) for 55 kDa band, (▦) for 58 kDa band, (▧) for 90 kDa band and (▨) for 100 kDa band. Values marked with different letters are significantly different (\* $P \leq 0.05$ ).

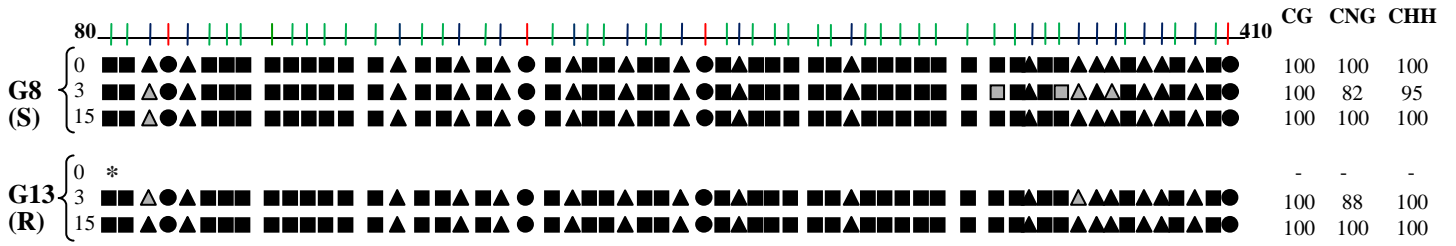


**Figure 6.** Factorial analysis (Principal Components Analysis) of the *Beta vulgaris altissima* genetic variability of epigenetic parameters measured under (A) vernalization at 4°C or (B) devernalization at 26°C treatments. For these treatments, the distribution of several epigenetic parameters and the projection of bolting parameters are shown in the main factorial plane F1×F2 of PCA. F1 and F2 are linear combinations of the four epigenetic variables.

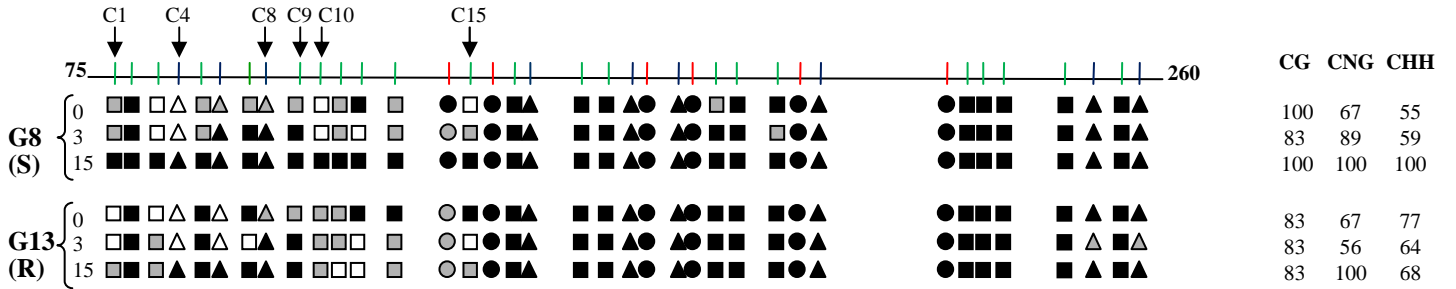


**Figure 7.** Semi-quantitative RT-PCR analyses of sugar beet homologous genes of the *Arabidopsis* vernalization pathways. SqRT-PCR were performed with total RNA isolated after 0, 3 or 15 weeks of vernalization at 4°C and used *TUBULIN* and *UBIQUITIN* as internal controls. S and R indicate sensitive and resistant genotypes respectively. (A) Sq RT-PCR of *BvFLC*, *BvFWA*, *BvVIN3*, *BvVRN2* on acrylamide gel. Modification of mRNA accumulation of: (B) *BvFLCa* and *BvFLCb* corresponding to alternative splicing of FLC locus, (C) *BvFWA*, (D) *BvVIN3*, (E) *BvVRN2* during vernalization treatment for G7, G8, G12 and G13 genotypes. Quantifications of 30 cycles RT-PCR products were performed with Image Tool software and genes values were corrected by the expression of *TUBULIN* and *UBIQUITIN* considered as stable.

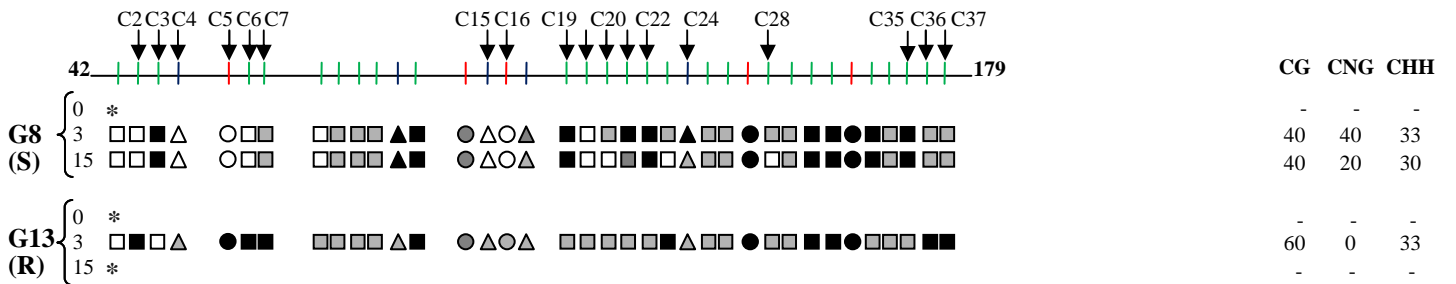
*BvFLC*



*BvVIN3*



*BvVRN2*



*BvFWA*\*

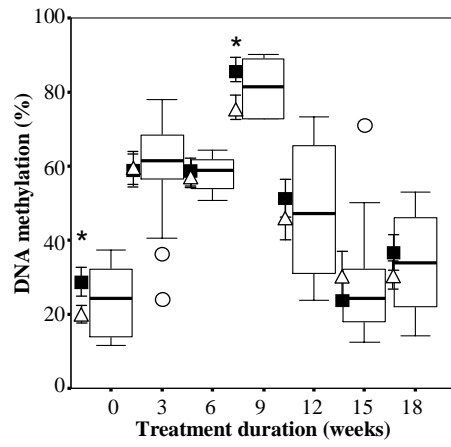
**Figure 8.** Analysis of cytosine methylation status of genomic sequences in G8 and G13 sugarbeet genotypes. S and R indicate sensitive and resistant genotypes respectively. Methylation pattern analysis of selected regions of homologous genes was performed by bisulfite sequencing. CG, CNG (N = A, T, C or G) and CHH (H = A, T or C) sites in both sequences are shown respectively by circles, triangles and squares. For each sample 2<sup>40</sup> PCR amplicons were sequenced. A methylcytosine percentage was determined for each cytosine site. Cytosine site was considered to be methylated when % mC was more than 70% (filled circles, triangles or squares). Cytosine site was considered with intermediate state when % mC was comprise between 30 and 70% (grey circles, triangles or squares). Cytosine site was considered as an unmethylated cytosine when %mC was lower than 30% (open circles, triangles or squares). Arrows point to cytosine methylation polymorphism between different durations of vernalization or between S and R genotypes.

\* Les profils de méthylation de *BvFWA* et ceux manquant pour *BvFLC* et *BvVRN2* sont en cours d'analyse et n'ont pu être intégrés dans ce manuscrit. Ils seront ajoutés pour la soumission de cet article

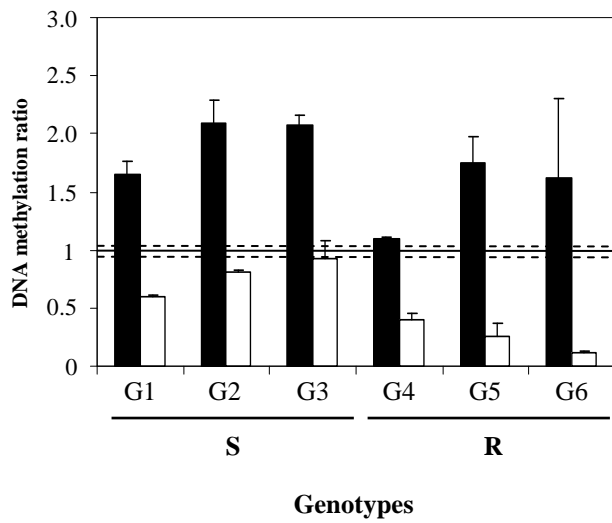
**Table S1.** Summary of plant material, treatment conditions and sampling.

Treatment designation	Abbreviation	Number of genotypes	Number of plants by genotypes	Chemical treatment			Thermal conditions			First sampling	Thermal conditions	Second sampling
				Chemical product	Concentration	Application period and frequency	Period 1	Period 2	Period 3	Number of plants (shoot apexes)	Period 4 (Bolting)	Number of plants (shoot apexes)
Control	C22	6	24	None	None	None	8 weeks at 22°C from seeds	0 weeks at 22°C 6 weeks at 22°C 12 weeks at 22°C 18 weeks at 22°C	None	14	6 weeks at 22°C	10
Control with DNA hypomethylating treatment	C22H <sup>-</sup>	6	24	5-Azacytidine	250 µM	Every 6 weeks from seed germination to SAMs sampling	8 weeks at 22°C from seeds	0 weeks at 22°C 6 weeks at 22°C 12 weeks at 22°C 18 weeks at 22°C	None	14	6 weeks at 22°C	10
Vernalization at 4°C	V4	18	24	None	None	None	8 weeks at 22°C from seeds	0 week at 4°C 3 weeks at 4°C 6 weeks at 4°C 9 weeks at 4°C 12 weeks at 4°C 15 weeks at 4°C 18 weeks at 4°C	None	14	6 weeks at 22°C	10
Vernalization at 7°C	V7	6	24	None	None	None	8 weeks at 22°C from seeds	0 weeks at 7°C 6 weeks at 7°C 12 weeks at 7°C 18 weeks at 7°C	None	14	6 weeks at 22°C	10
Vernalization at 7°C with DNA hypermethylating treatment	V7H <sup>+</sup>	6	24	Hydroxyurea	250 µM	Every 6 weeks from seed germination to SAMs sampling	8 weeks at 22°C from seeds	0 weeks at 7°C 6 weeks at 7°C 12 weeks at 7°C 18 weeks at 7°C	None	14	6 weeks at 22°C	10
Vernalization at 4°C followed by devernalization at 26°C	V4D	6	24	None	None	None	8 weeks at 22°C from seeds	0 week at 4°C 3 weeks at 4°C 6 weeks at 4°C 9 weeks at 4°C 12 weeks at 4°C 15 weeks at 4°C 18 weeks at 4°C	1 week at 26°C 1 week at 26°C 1 week at 26°C 1 week at 26°C 1 week at 26°C 1 week at 26°C 1 week at 26°C	14	6 weeks at 22°C	10

## Vernalization (4°C)

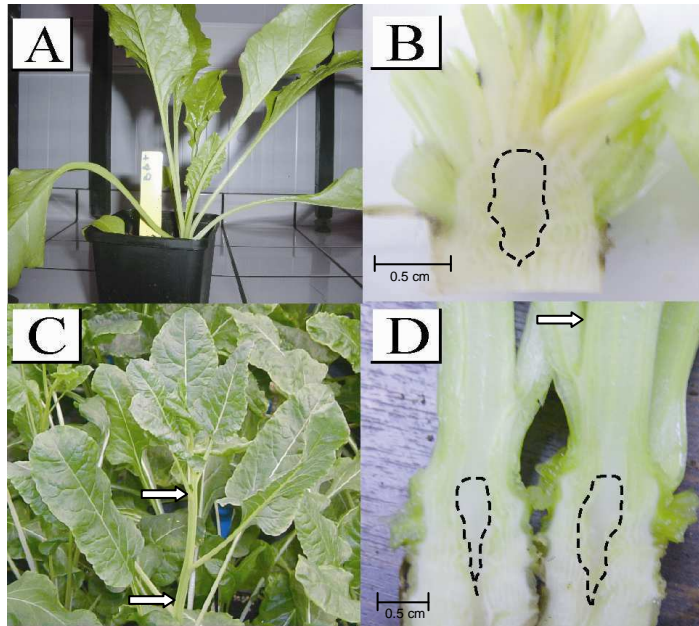


**Figure S1.** Genotypic diversity of global DNA methylation percentage in sugar beet. Box plots show genetic variations of %mC recorded in 18 genotypes during 0, 3, 6, 9, 12, 15 and 18 weeks of vernalization treatment at 4°C. The mean of bolting resistant and sensitive genotypes is indicated by open triangle and filled square respectively. Means  $\pm$  standard errors were presented for each treatment. Corresponding meaning differences are indicating with \*  $P \leq 0.05$ .



**Figure S2 .** Effect of hypo-methylating (□) and hyper-methylating (■) treatments on global genomic DNA methylcytosine content of six sugar beet genotypes (G1 to G6). Treatments were performed during 18 weeks. %mC of control treatment (22°C) or vernalization (7°C) plants are represented with black horizontal line. Means  $\pm$  standard error are indicated with dotted line. %mC of hypo and hyper-methylated treated plants are represented with white and dark bars respectively with their corresponding standard errors. S, bolting sensitive genotypes; R, bolting resistant genotypes

**Figure S3.** (A) Two weeks germinated sugarbeet plantlets. (B) Eight weeks sugarbeets before treatment. (C) 26 weeks sugarbeets at the end of the treatment. (D) Longitudinal section of a 26 weeks sugarbeet vegetative shoot apex. Vegetative meristem collected during first sampling is delimited in dark dotted line. (E) 32 weeks bolting sugarbeets after optimal bolting conditions treatment. (F) Longitudinal section of a 32 weeks sugarbeet shoot apex. Meristem collected during second sampling after optimal bolting conditions is delimited in dark dotted line. Elongating stem after bolting is indicated by white arrow.



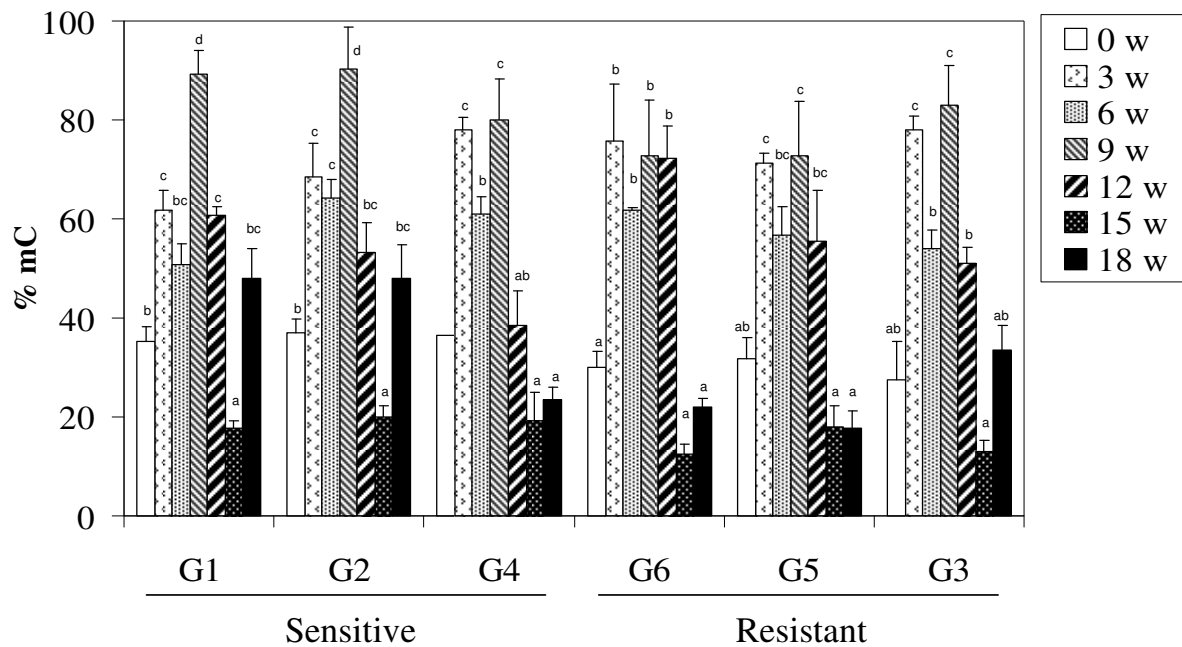




**Bilan :**

Dans cette étude, des variations importantes des marques épigénétiques ont été mesurées lors de la vernalisation et pour la première fois lors de la dévernalisation. Des corrélations négatives ont pu être établies entre des paramètres épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN et le ratio d'acétylation des histones avec le pourcentage de plantes montées à graine après vernalisation. En outre, une hypométhylation globale de l'ADN a été observée mais elle reste cependant insuffisante pour induire une montaison, contrairement à ce qui est observé chez *Arabidopsis*. Par contre, un traitement hyperméthylant peut inhiber et retarder la montaison. Concernant, le taux global d'acétylation des histones H3, des modifications n'ont pu être mises en évidence que lors de conditions induisant mais de façon sub-optimale, une montaison. C'est pourquoi, il pourrait donc y avoir plusieurs états chromatiniens menant de façon plus ou moins rapide et efficace à la montaison. Nous avons ainsi trouvé que la cinétique et l'amplitude des variations du pourcentage global de méthylation étaient des points critiques pour l'induction et la rapidité du phénomène de montaison. Ainsi, des hybrides de sensibilité variable à la montaison présenteront des variations différentes des marques épigénétiques globales. Ce résultat a encouragé une étude au niveau de loci spécifiques. Pour cela nous avons étudié des homologues d'*Arabidopsis* de la voie de la vernalisation. Nous avons ainsi pu montrer que les homologues chez la betterave sucrière de *VIN3* et *VRN2* mais pas *FLC*, sont directement régulés par l'état de méthylation de leur séquence lors de la vernalisation et présentent même un polymorphisme de méthylation au cours de la vernalisation et entre génotypes sensibles et résistants à la montaison.

Nos résultats montrent ainsi que la cinétique et l'amplitude des variations épigénétiques à un niveau global du génome ou à un niveau locus spécifique sont corrélées à l'induction et à la vitesse de montaison chez des génotypes de betterave sucrière, ouvrant des perspectives pour la sélection agronomique de cette espèce, par l'utilisation de biomarqueurs épigénétiques en sélection assistée par marqueurs.



**Appendix 1 .** Genetic variation of global genomic DNA methylation percentage at different 4°C vernalization treatment durations (0, 3, 6, 9, 12, 15 and 18 weeks) in shoot apex of six sugar beet hybrids. . Means are accompanied by their standard errors SE (n = 42). Values marked with different letters are significantly different at  $P \leq 0.05$ . Sensitive and resistant indicate genotype bolting sensitivity. w, weeks

### 3. Résultats complémentaires

Afin de synthétiser nos résultats en vue de leur publication, nous avons choisi de présenter les données sous forme de boîtes à moustaches. Dans cette partie, nous proposons de reprendre certaines données sous la forme d'histogrammes permettant de visualiser les résultats par hybride. Ces documents sont proposés comme des annexes à la publication (en anglais mais non publiées) pour les évaluateurs de celle-ci. Ils sont regroupés ici à titre documentaire afin d'éviter de les séparer de la publication en les mettant en annexe à la fin de ce mémoire.

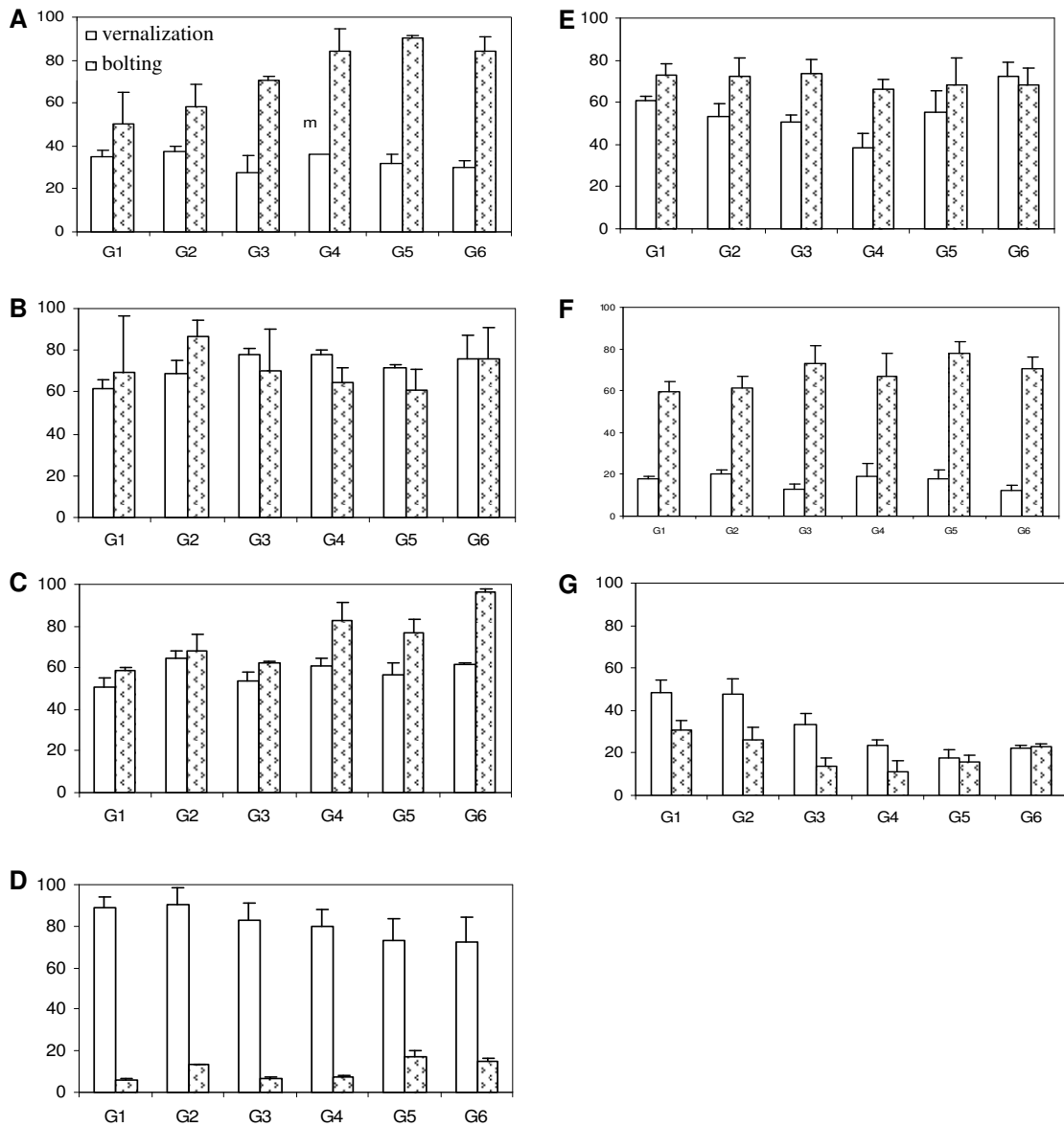
#### **Variations du pourcentage de méthylation global dans des apex caulinaires de betterave sucrière avant et après un traitement vernalisant à 4°C**

Au cours d'un traitement vernalisant de 4°C, le taux de méthylation global, mesuré dans les apex caulinaires, montre d'importantes variations cycliques (de plus de 80% à moins de 20%) avec deux phases d'hypométhylation de l'ADN à 6 et 15 semaines (**Appendix 1 et 2**). Ainsi, quel que soit le génotype, on observera les mêmes modifications, avec tout de même un pic plus franc à 9 semaines de vernalisation chez deux génotypes sensibles (G1 et G2). Ces variations globales du pourcentage de méthylation, sont compilées sous forme de boîtes à moustaches (box plots) et décrites de manière exhaustive dans la **publication n° 5**. Après chaque durée de traitement vernalisant, un lot de plantes est placé à 22°C avec des conditions optimales d'éclairage pour induire une montaison. Chez ces plantes, quel que soit le génotype, le pourcentage de méthylation montre toujours d'importantes variations avec deux phases d'hypométhylation à 9 et 18 semaines (**Appendix 2**).

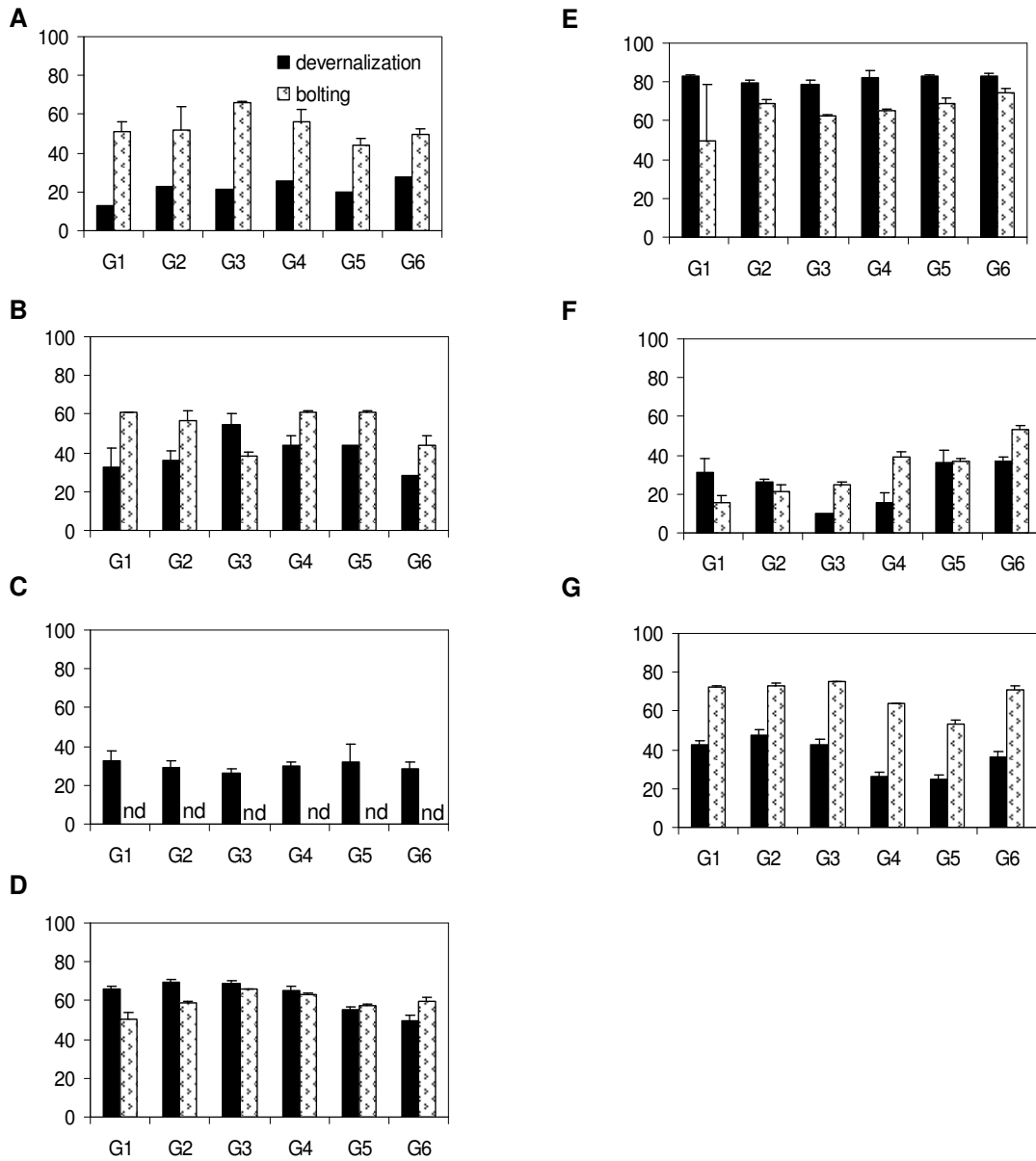
Les plantes vernalisées à 4°C, puis dévernalisées suite à un traitement d'une semaine à 26°C montrent également d'importantes variations du pourcentage de méthylation global, avec notamment un pic d'hyperméthylation de l'ADN à 12 semaines (**Appendix 3**). De même que pour le traitement vernalisant, les six génotypes présentent globalement les mêmes variations. Ces résultats sont décrits sous forme de boîtes à moustaches dans la **publication n° 5**. Enfin, pour les plantes dévernalisées puis laissées sous conditions optimales de

montaison, une phase d'hyperméthylation de l'ADN est observée à 0, 3 et 18 semaines par rapport aux plantes dévernalisées (**Appendix 3**). Ces plantes présentent également une phase d'hypométhylation à 15 semaines.

Plusieurs études révèlent que la vernalisation induit des modifications de la méthylation de l'ADN (Finnegan *et al.*, 1998; Steward *et al.*, 2000; Genger *et al.*, 2003). Notamment une hypométhylation de l'ADN est observée chez *Arabidopsis* au cours d'un traitement vernalisant (Finnegan *et al.*, 1998). Au contraire, chez la betterave sucrière, notre étude révèle que les variations de méthylation observées ne correspondent pas seulement à une hypométhylation mais à une succession de phases hypo- et hyper-méthylantes de l'ADN, avec une amplitude et une cinétique dépendantes de la température de vernalisation, de l'application ou non d'un traitement dévernalisant, de la durée du traitement et du génotype.



**Appendix 2 .** Variation of global genomic DNA methylation percentage at different treatment durations: (A) 0 week, (B) 3 weeks, (C) 6 weeks, (D) 9 weeks, (E) 12 weeks, (F) 15 weeks or (G) 18 weeks, in shoot apices of six sugar beet hybrids. Variations of global genomic DNA methylation percentage were measured immediately after 4°C vernalization treatment (white bars) or six weeks after optimal bolting conditions (hyphenated bars). Means are accompanied by their standard errors SE (n = 42).



**Appendix 3 .** Variation of global genomic DNA methylation percentage at different treatment durations: (A) 0 week, (B) 3 weeks, (C) 6 weeks, (D) 9 weeks, (E) 12 weeks, (F) 15 weeks or (G) 18 weeks, in shoot apex of six sugar beet hybrids. Variations of global genomic DNA methylation percentage were measured immediately after 4°C vernalization treatment followed by devernialization one week at 26°C (black bars) or six weeks after optimal bolting conditions (hyphenated bars). Means are accompanied by their standard errors SE (n = 42).

## Discussion et perspectives (**Contrat de recherche 44N et bourse CIFRE**)

Le phénomène de vernalisation et plus particulièrement son contrôle épigénétique a déjà été et est toujours très étudié chez des plantes annuelles telles qu' *Arabidopsis* et plusieurs espèces de céréales (Finnegan *et al.*, 2005 ; Yan *et al.*, 2006 ; Denis et Peacock, 2007). Cependant ces études sont surtout focalisées sur la régulation de répresseurs de la floraison tels que *FRI* et *FLC*, chez lesquels aucune régulation par la méthylation de l'ADN n'a été démontrée. En outre, même si la méthylation de l'ADN semble jouer un rôle lors de la vernalisation (Burn *et al.*, 1993 ; Finnegan *et al.*, 1998), son implication reste encore peu claire (Finnegan *et al.*, 2005).

Des travaux ont ainsi été initiés pour démontrer l'existence d'un contrôle épigénétique lors de la vernalisation et afin de caractériser ce contrôle chez plusieurs génotypes d'une espèce d'intérêt agronomique: la betterave sucrière. Nous avons réalisé un suivi des variations de la méthylation de l'ADN, du ratio d'acétylation des histones et des activités enzymatiques qui leur sont associées avant, pendant et après la vernalisation. Mon objectif de thèse, sur cette partie, était d'initier ce travail et de le valoriser en termes de publications et de pistes pour des applications potentielles en sélection assistée par marqueurs. En effet, ce travail s'inscrit dans le cadre d'un contrat de recherche, du financement de ma thèse par la société SES-VanderHave et d'un projet de valorisation financé par le Conseil Régional de la Région Centre.

Nous avons démontré l'existence d'un contrôle épigénétique de la vernalisation et de la dévernalisation à partir de plusieurs génotypes de betterave sucrière. Notre hypothèse est que l'amplitude et la cinétique des variations épigénétiques contrôlent l'induction de la montaison et sa rapidité, permettant ainsi de confirmer le rôle de la méthylation de l'ADN dans ce processus. De plus, nous avons pu établir l'existence d'un polymorphisme épigénétique au niveau du génome ou de séquences spécifiques entre génotypes résistants et sensibles à la montaison. Nous avons ainsi identifié deux premiers épiallèles de la vernalisation : *VNR2* et *VIN3*. Un point majeur de nos résultats est que ce polymorphisme est observable chez des plantules âgées de 8 semaines et n'ayant pas encore subi de traitement vernalisant. Ces deux derniers résultats nous ont encouragé à caractériser des loci cibles des remaniements de la méthylation de l'ADN et ceci dans l'objectif d'identifier des biomarqueurs épigénétiques du caractère de résistance à la montaison pour la mise au point d'un test de sélection. Un tel test n'existe pas actuellement. Ce travail est présenté dans le chapitre 3.



Nous envisageons également d'autres perspectives à ce travail :

Concernant les homologues de la floraison, nous ferons plusieurs compléments :

(1) l'analyse de leur profil de méthylation sera effectuée sur un plus grand nombre de génotypes afin de pouvoir les valider comme marqueurs de la montaison;

(2) l'analyse comparative de leur profil de méthylation et d'expression au niveau ARNm sera effectuée sur des plantes après le traitement vernalisant lors des conditions optimales de montaison. Ceci afin d'étudier si ces modifications sont stables ou bien instables lors du retour aux températures optimales de croissance;

(3) l'analyse comparative de leur profil de méthylation et d'expression au niveau ARNm sera effectuée sur des plantes dévernalisées;

(4) l'analyse comparative de leur profil de méthylation et d'expression pourrait être réalisée sur la feuille qui est l'organe de perception du froid;

(5) d'autres homologues pourraient être analysés comme *LHP1*, des constituant du complexe polycomb 2 ou d'autres gènes qui sont en aval de *FLC* dans la cascade de la vernalisation (Figures 53 et 54).

Notre maîtrise des mesures au niveau génomique global, nous encourage à valoriser ce travail sur une thématique proche. En effet, un autre problème agronomique préoccupe les sélectionneurs, il s'agit du cas des betteraves annuelles. Aux champs, des annuelles sauvages peuvent germer et entraîner une pollution des stocks de graines ou s'hybrider avec les variétés cultivées, diminuant ainsi les futurs rendements en sucre. La différence phénologique en terme de floraison entre les betteraves sucrières annuelles et bisannuelles est déterminée au niveau du génotype par le locus B, encore appelé "gène de montaison" (Owen, 1954 ; Reeves *et al.*, 2007). Ainsi, les betteraves bisannuelles sont homozygotes récessives (bb) pour le gène de montaison, ce qui induit un besoin absolu en vernalisation. Cependant, si ces betteraves bisannuelles sont laissées de manière artificielle en conditions de jours longs, elles peuvent rester à l'état végétatif indéfiniment (Stout, 1945). Ainsi, seule une exposition prolongée au froid permettra la floraison de ces betteraves, bien qu'une exposition à des jours longs durant et après la vernalisation améliore cette transition. Au contraire, chez les annuelles (BB ou Bb), une exposition aux jours longs est nécessaire et suffisante pour induire une floraison. Dans le cas des annuelles, seul un traitement artificiel en jours courts peut les maintenir indéfiniment à l'état végétatif. Ainsi, chez la betterave sucrière, la floraison nécessite des conditions environnementales spécifiques, alors qu'*Arabidopsis* pourra fleurir sous des

conditions environnementales très variées et ceci grâce à une initiation de la floraison par la voie autonome (Koornneef *et al.*, 1998).

L'étude du contexte épigénétique chez ces variétés ne nécessitant aucune vernalisation pour fleurir permettrait de savoir si les forts remaniements épigénétiques s'opérant lors de la vernalisation sont bien dus au traitement vernalisant ou bien à un paramètre plus intrinsèque à la plante. En effet, nous envisageons d'étudier le contexte épigénétique global chez plusieurs lignées d'annuelles ayant des capacités ou des vitesses de montaison variables. L'objectif serait alors d'établir d'éventuelles corrélations entre les paramètres épigénétiques et la capacité de montaison en s'affranchissant d'un traitement. Des marqueurs épigénétiques d'annualité auraient un grand intérêt pour les sélectionneurs qui doivent actuellement tester par une méthode empirique, sur chaque lot vendu de bisannuelles, la contamination en annuelles. En effet, pour chaque lot des centaines de plantes sont semées en serre et le pourcentage de plantes montées en condition non-inductrice de la montaison (et donc d'annuelles) est dénombré manuellement, ce qui est long et fastidieux. Ce travail est envisagé dans le cadre d'un nouveau contrat de recherche avec la société SES-VanderHave (44N) et d'une **bourse de thèse CIFRE** (Claire Hébrard, 01/10/2008-31/09/2011).



# Chapitre 3

Recherche et validation de biomarqueurs  
épigénétiques de la sensibilité à la  
montaison chez la betterave sucrière

---



# Chapitre 3

## Recherche et validation de biomarqueurs épigénétiques de la sensibilité à la montaison chez la betterave sucrière

---

### Introduction

1. Contexte et objectifs (**Contrat de recherche 044N avec SES-VanderHave et CPR n°04.08.22 Biotechnocentre avec le Conseil Régional de la Région Centre**)
2. Caractérisation des épimutations induites lors de la vernalisation chez la betterave sucrière et identification de biomarqueurs épigénétiques de la sensibilité à la montaison (**publication n°5**)

Conclusions et perspectives (**Contrat de recherche 44N et thèse CIFRE**)



## Introduction

Après avoir mis en évidence dans le chapitre 2 l'existence d'un état de méthylation différent entre génotypes sensibles et résistants et ceci avant même un traitement vernalisant, nous avons initié la caractérisation de loci cibles du remaniement de la méthylation de l'ADN. Nous avons ensuite criblé ces marqueurs afin d'identifier parmi eux de potentiels biomarqueurs épigénétiques de la sensibilité à la montaison.

Ce chapitre se compose successivement d'un bref rappel sur le contexte des biomarqueurs épigénétiques, de la présentation des résultats obtenus lors de ma thèse sous la forme d'une publication intitulée « Characterization of epimutations in vernalized shoot apex of sugar beet hybrids with distinct bolting sensitivities » (**Trap-Gentil *et al.*, en préparation ; publication n°5**) et des conclusions et perspectives correspondantes.





## **1. Contexte et objectifs (Contrat de recherche 044N avec SES-VanderHave et CPR n°04.08.22 Biotechnocentre avec le Conseil Régional de la Région Centre).**

Bien que la mise en évidence d'un contrôle épigénétique de la vernalisation et en particulier par la méthylation de l'ADN, soit établie sur plusieurs espèces, les loci cibles des remaniements de l'ADN (épiallèles) sont peu connus. Chez la betterave sucrière, nous avons montré que des variations du pourcentage de méthylation global du génome dans l'apex caulinaire durant la vernalisation étaient corrélées à l'induction et la rapidité de la montée à graine chez plusieurs génotypes de betterave sucrière présentant une sensibilité différente à la vernalisation. Dans ce contexte, une recherche d'épiallèles a été initiée. A ce moment là (2005), l'analyse du méthylome n'était pas encore publiée (Zhang *et al.*, 2006) et deux types de techniques étaient alors utilisées (Gentil et Maury, 2007) :

- 1) les techniques utilisant un anticorps dirigé contre la 5-méthylcytosine (Salzberg *et al.*, 2004),
- 2) les techniques utilisant des enzymes de restriction dont la coupure est sensible à l'état de méthylation de l'ADN. En particulier, la méthode de RLGS permet l'identification des séquences différenciellement méthylées et avec une taille facilitant leur clonage. Nous disposions déjà d'une expérience sur cette technique (Chapitre 1 ; Causevic/Gentil *et al.*, 2006) et c'est pourquoi nous avons privilégié ce choix.

Nos objectifs étaient de caractériser des épiallèles lors de la vernalisation et de les cribler pour identifier des biomarqueurs de la sensibilité à la montaison en vue de la mise au point d'un test de sélection. En effet, ce travail s'inscrivait dans le cadre d'un contrat de recherche, ainsi que du financement de ma thèse par la société SES-VanderHave et d'un projet de valorisation financé par le Conseil Régional de la Région Centre. Ce travail a également fait l'objet d'un stage de Master 2 que j'ai co-encadré (Clément Lafon-Placette, Mars-Septembre 2008). La RLGS a donc été appliquée sur de l'ADN génomique extrait d'apex caulinaires issus de génotypes de betterave sucrière présentant une sensibilité différente à la vernalisation et soumis à différentes durées de traitement vernalisant. 39 marqueurs ont été séquencés et caractérisés par des analyses *in silico*. Le criblage de ces séquences a été initié par la méthode de séquençage au bisulfite (voir chapitre 1). L'ensemble des résultats est présenté ci-après dans la publication n°5.



2. Caractérisation des épimutations induites lors de la vernalisation chez la betterave sucrière et identification de biomarqueurs épigénétiques de la sensibilité à la montaison (**publication n°5**).

**Publication n°5 : Trap-Gentil, M.-V., Delaunay, A., Brignolas, F., Hagège, D., Joseph, C., Lefebvre, M., Barnes, S and Maury, S.** (in preparation). Characterization of epimutations in vernalized shoot apex of sugar beet hybrids with distinct bolting sensitivities.



## **Characterization of epimutations in vernalized shoot apex of sugar beet hybrids with distinct bolting sensitivities**

Marie-Véronique Trap-Gentil<sup>1,2</sup>, Alain Delaunay<sup>1,2</sup>, Franck Brignolas<sup>1,2</sup>, Daniel Hagège<sup>1,2</sup>, Claude Joseph<sup>1,2</sup>, Marc Lefebvre<sup>3</sup>, Steve Barnes<sup>3</sup> and Stéphane Maury<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES EA 1207, Faculté des Sciences, Université d'Orléans, rue de Chartres, BP 6759, 45067 Orléans Cedex 2, France.

<sup>2</sup> INRA, USC2030 Arbres et Réponses aux Contraintes Hydriques et Environnementales (ARCHE), F-45067 Orléans, France.

<sup>3</sup> SES-VanderHave N.V. /S.A., Soldatenplein Z2 nr15, Industriepark, B-3300 Tienen, Belgium.

Financial source: SES-VanderHave, Belgium and the Conseil Régional de la Région Centre, France and the Ministère de l'Education Nationale et de la Recherche, France.

Experiment stations: SES-VanderHave in Belgium and the Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures at the University of Orléans in France.

Author for correspondence: Stéphane Maury

Email: [stephane.Maury@univ-orleans.fr](mailto:stephane.Maury@univ-orleans.fr)

Tel: +33 (0)2 3841 7022

Fax: +33 (0)2 3841 7022

**Keywords:** bisulfite, CpG islands, DNA methylation, vernalization, RLGS

## **Abstract**

Although vernalization is regulated by epigenetic mechanisms at the global genome and locus specific levels, the role of DNA hypo-methylation and the corresponding loci are still poorly known. Changes in global methylation rates in the shoot apex during vernalization have previously been correlated with the induction and rapidity of bolting in sugar beet hybrids. Our aims were to characterize loci remodelled by DNA methylation during vernalizing treatment and then to screen these putative methylation biomarkers regarding bolting sensitivity in sugar beet hybrids. In this context, a genome-wide methylation scanning method the Restriction Landmark Genome Scanning (RLGS) was applied to sugar beet shoot apices submitted to different vernalizing treatments. For this study, 39 putative markers were isolated and cloned. Sequencing showed that their majority was associated with CpG islands and corresponded to expressed coding region. Methylation profiles were assessed by bisulfite sequencing and showed epimutations in body genes depending on the duration of the vernalizing treatment and the bolting sensitivity of the genotypes. Indeed, statistical correlations were established between some of these epimutations and the bolting sensitivity and rapidity. Thus, it is possible to use this strategy in the aim to identifying biomarkers of a phenotypic trait; our results open perspectives for sugar beet plant breeding strategy.

## **Introduction**

DNA methylation refers to the addition of a methyl group on a cytosine. In plants, methylation is located in CG, CNG (N could be A, T, C or G) and CHH (H could be A, T or C) contexts (Chan et al., 2005). Methylation is catalyzed by several DNA methyltransferases: DNMT1 (*MET1* in *Arabidopsis*), the DRM1/2 and the plant-specific CMT3. DNA methyltransferases have been found in protein complexes containing histone deacetylase or histone methyltransferase activity (Fuks et al., 2003; Rountree et al., 2000). Thus, changes in DNA methylation are associated with histone modifications and affect chromatin structure and *vice versa* (Gendrel et al., 2002; Ng and Bird, 1999; Jackson et al., 2002; Tamaru and Selker, 2001). DNA methylation is also involved in the binding of proteins such as MBP which recruits protein complexes and it is associated with chromatin remodelling proteins (Hung and Chen, 2003; Springer and Kaeppler, 2005). The relationship between DNA methylation and chromatin remodelling proteins was demonstrated by the study of *DECREASED DNA METHYLATION 1* mutant (*ddm1*) which displays DNA hypomethylation (Brzeski and Jerzmanowski, 2003; Jeddloh et al., 1999; Vongs et al., 1993). Genome-wide DNA methylation mapping has already been reported in *Arabidopsis* and rice (Cokus et al., 2008; Li et al., 2008; Zhang et al., 2006). Interestingly, the role of DNA methylation in regulating transcription appears to depend on the position of methylation relative to genes. Methylation in promoters appears to repress transcription. Paradoxically, body-methylated genes are usually transcribed at moderate to high levels and are transcribed on a less tissue-specific manner than unmethylated genes (Vaughn et al., 2007; Zilberman et al., 2007, Zhang, 2008).

Vernalization, which is the requirement of a prolonged period of cold that induce or accelerate flowering (Chouard, 1960), is considered as a model for the study of epigenetic regulation in eukaryotes (Schmitz and Amasino, 2007). Thus, in vernalized plants, flowering will only occur when optimal photoperiod is perceived attesting the existence of a cell memory. This phenomenon is transmissible through mitosis (Holliday, 1990) but not meiosis (Metzger, 1988) and was shown to be epigenetically regulated. Thus, several studies, using DNA hypo-methylating treatments or defective in methylation mutants (*MET1*, *ddm1*) in *Arabidopsis*, wheat or flax revealed an association between DNA methylation and early flowering (Burn et al, 1993; Brock and Davidson, 1994; Fieldes et al., 2005; Finnegan et al., 1998). However, other ecotypes of *Arabidopsis* presenting stable low level of DNA methylation were found to flower later than control lines with normal level of DNA methylation (Ronemus et al 1996; Kakutani, 1997). Furthermore, in *Arabidopsis*, *FLC*



(*FLOWERING LOCUS C*) identified as the principal flowering repressor is directly regulated by several histone modifications (Sheldon et al., 2000; Sung and Amasino, 2004). *FLC* and flanking genes are downregulated in plants with reduced level of DNA methylation (Sheldon et al., 1999; Finnegan et al., 2004 and 2005). *FLC* is not directly regulated by DNA methylation as there is no change in DNA methylation within the *FLC* gene segment that is necessary for the vernalization response (Sheldon et al., 2002; Finnegan et al., 2005). The role of DNA hypo-methylation and the corresponding target loci are still poorly known.

This study focused on sugar beet (*Beta vulgaris altissima*), a crop of economic importance. This biennial plant has an absolute requirement for vernalization, depending on the genotype (Lexander, 1980). Previously, it was reported that sugar beet morphogenesis is epigenetically regulated (Causevic et al., 2005; Causevic et al., 2006) and that kinetics and amplitude of global DNA methylation were associated with bolting induction in a genotype-dependant manner in vernalized shoot apex (Trap-Gentil et al., in prep.). Our aim was first to characterize loci remodelled by DNA methylation during vernalizing treatment and then to screen these methylation biomarkers (Gentil and Maury, 2007) regarding bolting sensitivity in sugar beet hybrids. In this context, a genome-wide methylation scanning method called Restriction Landmark Genome Scanning (RLGS) approach, usually employed for the detection of methylation markers in human cancers (Costello et al., 2002; Rush and Plass, 2002; Beck and Rakyán, 2008) was followed for the study of sugar beet shoot apex submitted to various durations of vernalizing treatment. Cloning and characterization of the corresponding markers showed that most of them are associated to CpG islands, coding region and putative expression. Bisulfite sequencing was used to precisely describe the methylation profile regarding durations of the vernalizing treatment and in few genotypes with distinct bolting sensitivities. Our data showed that it is possible to use this strategy to identify biomarker of a phenotypic trait thus opening perspectives for sugarbeet breeding.

## **Results and discussion**

### **Identification of epimutations by RLGS in vernalized shoot apex of sugar beet hybrids**

In order to identify target loci of DNA methylation during vernalization, the RLGS method was used. This method provides a quantitative epigenetic assessment of several gene-associated CpG island highly reproducible in a single gel without prior knowledge of the sequence (Costello et al., 2002). RLGS has already been used for the characterization of biomarkers of human cancers (Rush and Plass, 2002; Beck and Rakyan, 2008; Wang et al., 2008). In this study, we used RLGS to identify loci with distinct methylation status in DNA extracted from sugar beet apices after 0, 3, 15 or 18 weeks of vernalizing treatment from two different hybrids. Hundred of spots were observed for the entire experiment (Fig.1). Spots could be classified in two categories: (1) spots that could be superposed between two RLGS profiles and (2) spots that are unique to one RLGS profile. Single spots represented loci with distinct methylation status (epimutation) while intensity of superposable spots indicated allelic enrichment between two DNA extracts. Changes in DNA methylation were observed according to treatment duration (Fig 1) and genotype (data not shown). Here, 84 fragments were extracted from gel, cloned and sequenced. Only 39 distinct sequences were obtained (Table I). 4 Spots were superposed in at least two RLGS profiles and corresponded to the same sequence thus confirming the reproducibility of the method. The intensities of these spots were similar between the two RLGS autoradiograms suggesting no differential allelic enrichment (Fig. 1). Fragments of 8 markers were found two to four times in the same gel. 10 Markers corresponding to one single spot in one gel were found in another part of a second gel (Table I). This result suggested that RLGS scanning was performed in a precise part of the genome. 25 Spots out of the 39 were found only one time. These data are in agreement with those already published on plants (Abe et al., 2002; Matsuyama et al., 2003; Causevic et al., 2006).

### **Characterization of RLGS markers**

The 39 distinct markers displayed at sizes ranging from 121 bp to 859 bp (Table I). A CpG island is defined by a C+G content of more than 50%, an observed versus expected ratio for the occurrence of CpGs of more than 0.60 and a minimum size of 200 bp (Takai and Jones, 2002). Most of the studied markers (37 out of 38) were associated to CpG islands (Fig. 2A and B). One marker with a size smaller than 200 bp could not be analyzed. In animals, approximately 60% of all promoters and first exons colocalize with CpG islands (Antequera, 2003). Furthermore, DNA replication was shown to initiate at CpG islands *in vivo* suggesting

a coordinated regulation of transcription and replication. CpG-rich regions are methylated and associated with inactive DNA in animals (Jeddeloh et al., 1998; Kooter et al., 1999; Wolffe and Matzke, 1999; Meyer, 2000; Bender, 2001; Vaucheret and Fagard, 2001; Richards and Elgin, 2002; Robertson, 2002). Gene-associated CpG islands are mostly not methylated and are usually linked to transcriptionally active DNA (Panstruga et al., 1998; Razin, 1998; Antequera and Bird, 1999; Jones, 1999; Ng and Bird, 1999; Ashikawa, 2001; Li et al., 2001). In plants, prediction programs have been developed to search for the presence of CpG islands in the 5' region of genes (Ioshikhes and Zhang, 2000; Ohler et al., 2001; Davuluri et al., 2001; Down and Hubbard, 2002; Ponger and Mouchiroud, 2002). In *Arabidopsis*, these studies shown that although CpG islands are not specifically located in the promoter regions in *Arabidopsis*, GC-skews ( $=\frac{C-G}{C+G}$ ), where C and G denote the numbers of cytosine and guanine residues, were recently reported near the transcription start sites (TSS) of genes. Furthermore, prediction programs to CpG islands has described gene-associated CpG islands in rice (Ashikawa, 2001), suggesting different situations in plant species.

The results of homology studies, corresponding to the best BLAST matches are described in Table I and Figure 2C respectively. About half of our putative markers (21 out of the 39) revealed no significant matching, only one marker was not associated to a potential open reading frame (ORF). The other markers presented homologies with unknown function proteins (6); proteins involved in cell cycle or cell signaling (5) such as a cell division control protein, a serine/threonine kinase, a RNA cytosine methyltransferase and a defensive responsive protein; proteins involved in metabolism (5) such as a pectase lyase, a glutathione-S-transferase, a cyclopropane fatty acid synthase; and retrotransposon protein (1). These results are in agreement with previous ones reported on biomarkers of morphogenesis in sugar beet cell lines (Causevic et al., 2006). Nevertheless, some sequences are certainly not directly associated with vernalization but more likely to the genetic reworking of the flowering meristem. Thus, variations of DNA methylation during vernalization were reported to be very important at the genome scale and are not only focused on vernalization genes (Sherman and Talbert, 2002; Trap-Gentil et al., in prep.). More work is needed to understand the role in vernalization of markers such as the RNA cytosine methyltransferase and those whose functions are as yet unknown. Thus, no data is actually available about the role of RNA methylation in a physiological process as vernalization. In order to assess if these markers are expressed, sugar beet EST databases were blasted (Fig. 2D). About all markers matched ESTs found in root, leaf, inflorescence or entire plantlets (37 out of the 38). One marker with no ORF was not analyzed. About half of them had more than 5 ESTs.

Altogether, our data showed that typical RLGS marker in sugar beet displayed CpG island associated with expressed gene of known or unknown function in good agreement with previous reports on this plant and human (Causevic et al., 2006; Costello et al., 2002; Rush and Plass, 2002; Beck and Rakyan, 2008).

### **Methylation profiles of RLGS markers**

In order to select markers displaying changes in DNA methylation during vernalization in a genotype-dependant manner, the methylation status of four of them (17, 26, 33 and 34 respectively) was investigated using bisulfite sequencing (Fig. 3). DNA was extracted from shoot apices of two bolting sensitive (S) and two bolting resistant (R) genotypes after 0, 3 or 12 weeks of vernalization and treated with sodium bisulfite, which allows quantitatively measurement of the methylation percentage of each cytosine in CG, CNG or asymmetric CHH contexts (see materials and methods for more details). The four markers exhibited hyper-methylation of their sequences. Although, CpG islands associated genes are hypo-methylated in animals (Panstruga et al., 1998; Razin, 1998; Antequera and Bird, 1999; Jones, 1999; Ng and Bird, 1999; Ashikawa, 2001; Li et al., 2001); and in rice, it was reported that methylation status and tissue expression of these sequences depend on the position of the CpG islands within their associated genes (Ashikawa et al., 2001). Markers 17 and 34 were found to be hyper-methylated with rare modifications among genotypes or durations of treatment. In contrast, the selected region of markers 26 and 33 showed several variations of methylation in all cytosine contexts and particularly in asymmetric CHH context for marker 33. Thus, changes in cytosine methylation status were observed at several positions according treatment durations (0, 3 and 12 weeks) for a given sequence. Furthermore, methylation polymorphism was established between resistant and sensitive genotypes for both markers: such as the sites C15, C16 and C17 at 0 week of vernalization for marker 26 and the sites C4, C10 and C12 at 3 weeks of vernalization for marker 33. In *Arabidopsis*, targets of DNA methylation during vernalization are not characterized and in particular *FLC* and flanking genes are not directly regulated by DNA methylation (Finnegan et al., 2005). It was proposed that DNA methylation modulates a transcriptional regulator common to both *FLC* and the *FLC*-like *MAF* gene family. Although *FLC*-like gene in sugar beet does not seem to be regulated directly by DNA methylation, bolting genes known to control *FLC* such as *VIN3* and *VRN2* were shown to be directly regulated by gene body methylation during vernalization with differences between resistant and sensitive bolting plants (Trap-Gentil et al., in prep.). Here, the characterization of new loci affected by global DNA methylation during vernalization is reported for the first time to our knowledge.

### **Screening of the methylation biomarkers in function to bolting sensitivity**

Results of linear correlations (Pearson's coefficient,  $r$ ) established between the methylation percentages of each or all cytosines of a marker, the levels of global genome epigenetic modifiers and the levels of bolting parameters (previously reported in Trap-Gentil et al., in prep.) are presented in Table II. Although marker 17 is hyper-methylated, the corresponding percentage of methylation of this sequence was positively correlated ( $r = 0.87^*$ ) to the global variations of DNA methylation at the genome scale during vernalization (Table II and Fig. 4A). This suggests that this marker is specifically regulated by the variations of DNA methylation during vernalization. Methylation percentage of the cytosines 10 and 14 of marker 33 were positively and negatively correlated to bolting index (BI) ( $r = 0.62^*$  and  $0.64^*$ ) and bolting delay (BD) ( $r = -0.62^*$  and  $-0.63^*$ ) respectively (Table II and Fig. 4B, 4C, 4D and 4E). This is in good agreement with our previous report where BI and BD scaled negatively (Trap-Gentil et al., in prep.). Resistant genotypes displayed DNA hypomethylation of the cytosines 10 and 14 at different durations of vernalization compared to sensitive genotypes. This result proposes that marker 33 could be a DNA methylation target locus during vernalization which is importance for bolting. The functional characterization of this coding sequence without significant matching in plant genome databases should now be envisaged. Whatever, such a polymorphism of methylation corresponds to a new type of molecular markers (Gentil and Maury, 2007).

## **Conclusion**

Our study aimed first to characterize loci targeted DNA methylation during vernalizing treatment. Changes in DNA methylation patterns was observed depending on both treatment duration and genotype and 39 distinct sequences were isolated. These markers corresponding to epimutations displayed highly methylated CpG islands associated with expressed genes of known or unknown functions. Our work was first to identify, without previous knowledge of sequence or gene function, the sequences targeted by DNA methylation during vernalization. Parts of these sequences are certainly not directly associated to this process but more generally to the genetic reworking of the flowering meristem. In order to select few markers, their methylation status was investigated. The data showed changes linked to treatment duration and to genotypes with distinct bolting sensitivities. Statistical correlations of these profiles with bolting characteristics allowed the screening of one marker that could be a determinant of bolting in sugar beet. More work is now necessary to elucidate the role of this marker in vernalization. Nevertheless, this polymorphism of methylation could represent a new type of molecular biomarker (Gentil and Maury, 2007). Indeed, polymorphism of DNA methylation is already used for human cancer detection (Laird, 2003) and could now represent a tool in plant marker assisted selection when correlations can be established with a quantitative breeding trait.

## **Materials and Methods**

### **Plant material, growth conditions and treatments**

Four genotypes of biennial sugar beet hybrids (*Beta vulgaris altissima*, provided by SES-VanderHave, Belgium) were selected for their distinct bolting characteristics. These genotypes correspond to genotypes called G1, G2, G5 and G6 in our previous report (Trap-Gentil et al., in prep.). In this study are respectively re-named S1, S2, R1 and R2 in agreement with distinct bolting sensitivity. Plants were placed to germinate and grow in chamber during eight weeks at 22°C under a 16 h photoperiod (700  $\mu\text{M m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Vernalization treatment was performed at 4°C for 0, 3, 12, 15 or 18 weeks. For each genotype and treatment duration, a sampling of 24 plants was done as followed: shoot apices of 14 plants were immediately collected, cleared from differentiated tissues and frozen in liquid nitrogen. The 10 remaining plants were placed six weeks at 22°C under optimal bolting light conditions (1000  $\mu\text{M m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). During this period, two bolting parameters *i.e.* bolting index (BI) and bolting delay (BD) were daily followed-up. BI corresponds to the percentage of bolting plants and BD corresponds to the average number of days requires for a visible bolting initiation. Average BI and BD were respectively determined with values of BI and BD obtained after 0, 3 and 12 weeks. Genotypes S1, S2, R1 and R2 displayed an average BI to 84, 80, 24 and 28% and an average BD to 20.3, 21.4, 28.5 and 29.2 days, respectively. The approximately shoot apices were stored at -80°C until used.

### **Restriction landmark genome scanning method for methylation**

Restriction landmark genome scanning (RLGS) protocol was adapted from Causevic et al (2006). Briefly, 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  of genomic DNA digested with 20 U of *Not I* (Invitrogen, France) and incubated at 37°C for four hours. This enzyme allows DNA cleavage in one cytosine and guanine rich palindrome site  $5'\text{GCGGCCGC}3'$  but not if internal cytosine is methylated. Obtained restriction fragments were labeled with 26 U of Sequenase in the presence of 60  $\mu\text{Ci}$  [ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ] dGTP (20 mCi/mL, 6000 Ci/mM) and 40  $\mu\text{Ci}$  [ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ] dCTP (10 mCi/mL, 6000 Ci/mM) (ICN, France). After incubation at 37°C for 30 min, fragments were fractionated in the presence of 30 U of *Eco RV* (Sigma) during three hours at 37°C. First dimension separation of restriction fragments were performed on 0.8% (w/v) SeaKem agarose in glass tubes (20 cm long and 3 mm diameter). Running buffer was 1M Tris buffered at pH 8.20 supplemented with 360 mM NaCl, 400 mM sodium acetate and 40 mM EDTA. Migration was done at 200 V during 2 hours, then at 230 V during 8 hours. After migration, gels were removed from the glass tubes and washed two times for 10 min in 20 mM Tris HCl

buffered at pH 7.4, containing 100 mM MgCl<sub>2</sub> and 100 mM NaCl. DNA fragments were *in gel* digested with 1 000 U *Hinf* I (Amersham Biosciences, France) with 0.1 % BSA (p/v) for two hours at 37°C. Second dimension separation of restriction fragments was performed on 5% (w/w) polyacrylamide gel (acryl/ bisacrylamide, 19: 1) in gel slab (40 x 33 cm). Migration was done at 100 V during 24, hours in 89 mM Tris HCl buffered at pH 8.3, containing 60 mM boric acid and 2 mM EDTA. After migration, second dimension gel was vacuum dried and exposed to autoradiographic film (KODAK biomax MS, Amersham, France). Spots were then cut from the gels and DNA was eluted in 30 µL de Tris EDTA (10/0.1) (v/v). RLGS fragments were cloned according to Causevic et al., (2006) after ligation of adapters, PCR amplification and subcloning in TOPOTA cloning kit (InVitrogen, France). Sequencing was performed using the Big-Dye Terminator v3.1 sequencing kit and carried out with a ABI 3100 automatic sequencer (PE Applied Biosystem, USA).

### **Bioinformatics analyses of RLGS markers**

CpG islands are defined as a contiguous window of DNA of 200 base pairs with the C+G percentage is at least 55% and the ratio of observed CpG frequency over the expected frequency exceeds 0.60 (Takai and Jones, 2002). CpG islands were analysed using ‘CpG island Searcher’ software (<http://cpgislands.usc.edu/>; Takai and Jones, 2003). This software provides a graphical map of CpG dinucleotides distribution and location of CpG islands. ORF identification was realized using ‘genscan’ software (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/MobylyePortal/portal.py?form=genscan>). Blast analyses (TBLASTX and BLASTN) were performed using several plant genomic databases (<http://blast.jcvi.org/er-blast/index.cgi?project=ath1>; <http://blast.jcvi.org/euk-blast/index.cgi?project=tae1>; <http://blast.jcvi.org/er-blast/index.cgi?project=zma1>; <http://blast.jcvi.org/eukblast/index.cgi?project=osa1>; <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/Blast/index.cgi> ). ESTs corresponding to RLGS markers were identified by blasting the sugar beet EST database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/PLANTS/PlantESTBLAST.shtml>).

### **Bisulfite conversion of genomic DNA and controls**

Treatment of genomic DNA with bisulfite deaminates unmethylated cytosine residues (Cs) to uracils (Us), which are recognized as thymines (Ts) in subsequent PCR amplification and sequencing. Whereas, 5-methylcytosines (mCs) remain unchanged by this treatment and are therefore detected as cytosines. This method allows direct and positive determination of methylation sites. Epitect bisulfite kit (Qiagen, USA) and 500 ng of genomic DNA were used according to manufacturer's recommendations. The percentage of conversion was determined



by HPLC approach and the methylation status of CCGG sites was confirmed by methylsensitive PCR using *HpaII* / *MspI* enzymes as previously described in Trap-Gentil et al., (in prep.).

### **Bisulfite PCR and sequencing analysis**

In order to minimize mismatches due to bisulfite conversions at 3'-OH extremity, degenerated nucleotide Y (where Y = C, T) and R (where R = G, A) were used in the forward and reverse primers respectively. Primers respectively tailed with M13 forward 5'TGTAAAACGACGGCCAGT3' or M13 reverse 5'CAGGAAACAGCTATGACC3' were designed with EPrimer3 software (<http://mobyte.pasteur.fr/cgi-bin/MobytePortal/portal.py?form=eprimer3>) and verified using Net Primer software (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html#>). Addition of M13 tails to the primers allows a direct sequencing of the PCR product without any cloning step. Sequences of primers for methylation markers 17, 26, 33 and 34 were respectively: 5'CTTTCATGGCGTTCAGYAG3' and 5'ATCGAGCAAACCGATGACA3' or 5'GGTTACAAAATCGCACAAAYG3' and 5'GCCAATCTGCTTAACACCAA3' or 5'GCGAACAATTTCCAGGTTTY3' and 5'TACAGCGAGGGTTTGAGARC3' or 5'CAATTCCACACAACATAYGA3' and 5'GCCTTTGAGTGAGGTGATAC3'.

Determination of the optimal temperature for primer annealing, subsequent PCR amplification and PCR products purification were realized according to Trap-Gentil et al., (in prep.). M13-tailed PCR products were purified on Centri-Sep® columns (Applied Biosystems) according to manufacturer's protocols and sequenced on an automated DNA sequencer ABI 3100 (Applied Biosystems, USA). Electrophoregrams were analyzed with BioEdit software. For each cytosine position, the height of cytosine and thymine peaks were estimated, corrected with the conversion percentage and used to calculate the methylation percentage. Three replicates for each sequence were done.

### **Statistical analysis**

Statistical analyses were realized using SPSS statistical software package (SPSS version 11.0.1 PC, Chicago, IL, USA). Means are expressed with their standard error and compared by ANOVA (GLM procedure). All statistical tests were considered as significant at \*  $P \leq 0.05$ . Relationships between levels of bolting parameters (BI, BD), levels of global genomic DNA methylation percentage previously reported in Trap-Gentil et al., (in prep.) and epigenetic characteristics of selected RLGS sequences (methylation level of sequence,

methylation level of cytosine in different context, methylation level of specific cytosine) during vernalization were computed by linear correlation (Pearson's coefficient,  $r$ ).

### **Acknowledgement**

This work and a Ph-D grant (M-V. Trap-Gentil) were supported by SES-VanderHave, Belgium and the Conseil Régional de la Région Centre, France. The authors would like to acknowledge Marie-Claude Lesage-Descauses and Emmanuelle Magnoux from INRA of Orléans for their technical help. We also thank Gilles Moreau and Laurent Jean-Alphonse for technical assistance.

## Literature cited

- Abe T, Matsuyama T, Sekido S, Yamaguchi I, Yoshida S, Kameya T** (2002) Chlorophyll-deficient mutants of rice demonstrated the deletion of a DNA fragment by heavy-ion irradiation. *J. Radiat. Res.* **43**: 157-161
- Antequera F** (2003) Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cell Mol. Life Sci.* **60**: 1647-1658
- Antequera F, Bird A** (1999) CpG islands as genomic footprints of promoters that are associated with replication origins. *Curr. Biol.* **9**: 661-667
- Ashikawa I** (2001) Gene-associated CpG islands in plants as revealed by analyses of genomic sequences. *Plant J.* **26**: 617-625
- Beck S, Rakyan V** (2008) The methylome: approaches for global DNA methylation profiling. *Trends Genet.* **24**: 213-237
- Bender J** (2001) A vicious cycle: RNA silencing and DNA methylation in plants. *Cell* **106**: 129-132
- Brock R, Davidson J** (1994) 5-Azacytidine and gamma-rays partially substitute for cold treatment in vernalizing winter-wheat. *Environ Exp. Bot.* **34**: 195-199
- Brzeski J, Jerzmanowski A** (2003) Deficient in DNA methylation 1 (DDM1) defines a novel family of chromatin-remodeling factors. *J. Biol. Chem.* **278**: 823-828
- Burn J, Bagnall D, Metzger J, Dennis E, Peacock W** (1993) DNA methylation, vernalization and initiation of flowering. *PNAS USA* **90**: 287-291
- Causevic A, Delaunay A, Ounnar S, Righezza M, Delmotte F, Brignolas F, Hagège D, Maury S** (2005) DNA methylating and demethylating treatments modify phenotype and cell wall differentiation state in sugarbeet cell lines. *Plant Physiol. Bioch.* **43**: 681-691
- Causevic A, Gentil M-V, Delaunay A, El Soud W, Garcia Z, Pannetier C, Brignolas F, Hagège D, Maury S** (2006) Relationship between DNA methylation and histone acetylation levels, cell redox and cell differentiation states in sugarbeet lines. *Planta* **224**: 812-827
- Chan S-L, Henderson I, Jacobsen S** (2005) Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **6**: 351-360
- Chouard P** (1960) Vernalization and its relations to dormancy. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **11**: 19-23

- Cokus S, Feng S, Zhang X, Chen Z, Merriman B, Haudenschild C, Pradhan S, Nelson S, Pellegrini M, Jacobsen S** (2008) Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning. *Nature*
- Costello J, Hong C, Plass C, Smiraglia D** (2009) Restriction landmark genomic scanning: analysis of CpG islands in genomes by 2D gel electrophoresis. *Methods Mol. Biol.* **507**: 131-148
- Costello J, Smiraglia D, Plass C** (2002) Restriction landmark genome scanning. *Methods* **27**: 144-149
- Davuluri R, Grosse I, Zhang M** (2001) Computational identification of promoters and first exons in the human genome. *Nat. Genet.* **29**: 412-417
- Down T, Hubbard T** (2002) Computational detection and location of transcription start sites in mammalian genomic DNA. *Genome Res.* **12**: 458-461
- Fieldes M, Schaeffer S, Krech M, Brown J** (2005) DNA hypomethylation in 5-azacytidine-induced early-flowering lines of flax. *Theor. Appl. Genet.*: 136-149
- Finnegan E, Genger R, Kovac K, Peacock W, Dennis E** (1998) DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization. *PNAS USA* **95**: 5824-5829
- Finnegan E, Kovac K, Jaligot E, Sheldon C, Peacock W, Dennis E** (2005) The downregulation of *FLOWERING LOCUS C (FLC)* expression in plants with low levels of DNA methylation and by vernalization occurs by distinct mechanisms. *Plant J.* **44**: 420-432
- Finnegan E, Sheldon C, Jardinaud F, Peacock W, Dennis E** (2004) A cluster of *Arabidopsis* genes with a coordinate response to an environmental stimulus. *Curr. Biol.* **14**: 911-916
- Fuks F, Hurd P, Wolf D, Nan X, Bird A** (2003) The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J. Biol. Chem.* **278**: 4035-4040
- Gendrel A, Lippman Z, Yordan C, Colot V, Martienssen R** (2002) Dependence of heterochromatic histone H3 methylation patterns on the *Arabidopsis* gene *DDM1*. *Science* **297**: 1871-1873
- Gentil M-V, Maury S** (2007) Characterization of epigenetic biomarkers using new molecular approaches. *In* R Varshney, R Tuberosa, eds, *Genomic assisted crop improvement, Vol 1: Genomic approaches and platforms*. Springer, pp 351-370
- Holliday R** (1990) DNA methylation and epigenetic inheritance. *Philos. T. Roy. Soc. B.* **326**: 329-338

- Hung M, Chen C** (2003) Eukaryotic methyl-CpG-binding domain proteins and chromatin modification. *Eukaryot. Cell* **2**: 841-846
- Ioshikhes I, Zhang M** (2000) Large-scale human promoter mapping using CpG islands. *Nat. Genet.* **26**: 61-63
- Jackson J, Lindroth A, Cao X, Jacobsen S** (2002) Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* **416**: 556-560
- Jeddeloh J, Bender J, Richards E** (1998) The DNA methylation locus *DDMI* is required for maintenance of gene silencing in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **12**: 1714-1725
- Jeddeloh J, Stokes T, Richards E** (1999) Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nat. Genet.* **22**: 94-97
- Jones P** (1999) The DNA methylation paradox. *Trends Genet.* **15**: 34-37
- Kakutani T** (1997) Genetic characterization of late-flowering traits induced by DNA hypomethylation mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **12**: 1447-1451
- Kakutani T** (1997) Genetic characterization of late-flowering traits induced by DNA hypomethylation mutation in *Arabidopsis thaliana*.
- Kakutani T, Munakata K, Richards E, Hiroshika H** (1999) Meiotically and mitotically stable inheritance of DNA hypomethylation induced by *ddm1* mutation of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **151**: 831-838
- Kooter J, Matzke M, Meyer P** (1999) Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. *Trends Plant Sci.* **4**: 340-347
- Laird P** (2003) The power and the promise of DNA methylation markers. *Nature* **3**: 253-264
- Lexander K** (1980) Present knowledge of sugar bolting mechanisms. *In*. In 43rd Winter Congress, Inst. Int. Rech. Betterav., Bruxelles, pp 245-258
- Li G, Chandrasekharan M, Wolffe A, Hall T** (2001) Chromatin structure and phaseolin gene regulation. *Plant Mol. Biol.* **46**: 121-129
- Li X, Wang X, He K, Ma Y, Su N, He H, Stolc V, Tongprasit W, Jin W, Jiang J, Terzaghi W, Li S, Deng X** (2008) High-resolution mapping of epigenetic modifications of the rice genome uncovers interplay between DNA methylation, histone methylation, and gene expression. *Plant Cell* **20**: 259-276

- Matsuyama T, Kimura M, Koike K, Abe T, Nakano T, Asami T, Ebisuzaki T, Held W, Yoshida S, Nagase H** (2003) Global methylation screening in the *Arabidopsis thaliana* and *Mus musculus* genome: applications of virtual image restriction landmark genomic scanning (Vi-RLGS). *Nucleic Acids Res.* **31**: 4490-4496
- Metzger J** (1988) Localization of the site of perception of thermoinductive temperatures in *Thlaspi arvense* L. *Plant Physiol.* **88**: 424-428
- Meyer P** (2000) Transcriptional transgene silencing and chromatin components. *Plant Mol. Biol.* **43**: 211-234
- Ng H, Bird A** (1999) DNA methylation and chromatin modification. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**: 158-163
- Ohler U, Niemann H, Liao G, Rubin G** (2001) Joint modeling of DNA sequence and physical properties to improve eukaryotic promoter recognition. *Bioinformatics* **17**: 199-206
- Panstruga R, Buschges R, Piffanelli P, Schulze-Lefert P** (1998) A contiguous 60 kb genomic stretch from barley reveals molecular evidence for gene islands in a monocot genome. *Nucleic Acids Res.* **26**: 1056-1062
- Ponger L, Mouchiroud D** (2002) CpGProD: identifying CpG islands associated with transcription start sites in large genomic mammalian sequences. *Bioinformatics* **18**: 631-633
- Razin A** (1998) CpG methylation, chromatin structure and gene silencing: a three-way connection. *EMBO* **17**: 4905-4908
- Richards E, Elgin S** (2002) Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing rounding up the usual suspects. *Cell* **108**: 489-500
- Robertson K** (2002) DNA methylation and chromatin: unraveling the tangled web. *Oncogene* **21**: 5361-5379
- Ronemus M, Galbiati M, Ticknor C, Chen J, Dellaporta S** (1996) Demethylation-induced developmental pleiotropy in *Arabidopsis*. *Science* **273**: 654-657
- Rountree M, Bachman K, Baylin S** (2000) *DNMT1* binds *HDAC2* and a new co-repressor, *DMAPI* to form a complex at replication foci. *Nat. Genet.* **25**: 269-277
- Rush L, Plass C** (2002) Restriction landmark genomic scanning for DNA methylation in cancer: past, present, and future applications. *Anal. Biochem.* **307**: 191-201
- Schmitz R, Amasino R** (2007) Vernalization: a model for investigating and eukaryotic gene regulation in plants. *Biochim. Biophys. Acta.* **26**: 365-370

- Sheldon C, Burn J, Perez P, Metzger J, Edwards J, Peacock W, Dennis E** (1999) The *FLF* MADS box gene: a repressor of flowering in *Arabidopsis* regulated by vernalization and methylation. *Plant Cell* **11**: 445-458
- Sheldon C, Conn A, Dennis E, Peacock W** (2002) Different regulatory regions are required for the vernalization-induced repression of *FLOWERING LOCUS C* and for the epigenetic maintenance of repression. *Plant Cell* **14**: 2527-2537
- Sheldon C, Rouse D, Finnegan E, Peacock W, Dennis E** (2000) The molecular basis of vernalization: the central role of *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. *PNAS USA* **97**: 3753-3758
- Sherman J, Talbert L** (2002) Vernalization-induced changes of the DNA methylation pattern in winter wheat. *Genome Res* **45**: 253-260
- Springer N, Kaeppler S** (2005) Evolutionary divergence of monocot and dicot methyl-CpG-binding domain proteins. *Plant Physiol.* **138**: 92-104
- Sung S, Amasino R** (2004) Vernalization and epigenetics: how plants remember winter. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 4-10
- Takai D, Jones P** (2002) Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *PNAS USA* **99**: 3740-3745
- Takai D, Jones P** (2003) The CpG island searcher: a new WWW resource. *In Silico Biol.* **3**: 235-240
- Tamaru H, Selker E** (2001) A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* **414**: 277-283
- Trap-Gentil M-V, Lafon-Placette C, Delaunay A, Hébrard C, Brignolas F, Hagege D, Joseph C, Lefebvre M, Barnes S, Maury S** (in prep.) Kinetics and genetic variations of DNA methylation and histone H3 acetylation at the global or locus specific levels in vernalized or devernalized shoot apex of sugar beet hybrids with distinct bolting sensitivities.
- Vaucheret H, Fagard M** (2001) Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends Genet.* **17**: 29-35
- Vaughn M, Tanurdzic M, Lippman Z, Jiang H, Carrasquillo R, Rabinowicz P, Dedhia N, McCombie W, Agier N, Bulski A, Colot V, Doerge R, Martienssen R** (2007) Epigenetic natural variation in *Arabidopsis thaliana*. *Plos Biol.* **5**: 1-13
- Vongs A, Kakutani T, Martienssen R, Richards E** (1993) *Arabidopsis thaliana* DNA methylation mutants. *Science* **260**: 1926-1928



- Wang S, Smiraglia D, Wu Y, Ghosh S, Rader J, Cho K, Bonfiglio T, Nayar R, Plass C, Sherman M** (2008) Identification of novel methylation markers in cervical cancer using restriction landmark genomic scanning. *Cancer Res.* **68**: 2489-2497
- Wolffe A, Matzke M** (1999) Epigenetics: regulation through repression. *Science* **286**: 481-486
- Zhang X** (2008) The epigenetic landscape of plants. *Science* **320**: 489-492
- Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, Cokus S, Chan S, Chen H, Hendersen I, Shinn P, Pellegrini M, Jacobsen S, Ecker J** (2006) Genome-wide high resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell* **126**: 1189-1201
- Zilberman D, Gehring M, Tran R, Ballinger T, Henikoff S** (2007) Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nat. Genet.* **39**: 61-69

## Tables

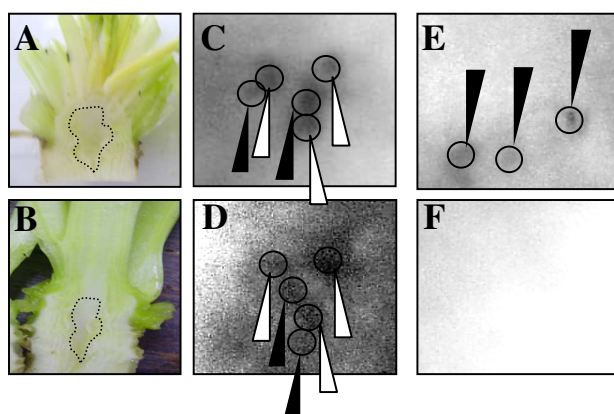
**Table I.** Accession numbers, sizes, highest BLAST results against plant databanks and RLGS profile for sugar beet genomic sequences identified by Restriction Landmark Genome Scanning.

Methylation marker number	Size (bp)	Plant BLAST identity	S				R
			0	3	15	18	0
1	350	no significant matching	1				
2	302	Sugar beet unknown function protein	1				
3	546	no significant matching	1	1			
4	425	Wheat unknown function protein	1*		1*	1	
5	457	no significant matching	1	2*	4	2*	4
6	257	no significant matching		1			
7	383	Maize cell division control protein		1			
8	496	Maize pectase lyase		1			
9	305	Rice glutathione-S-transferase		1			
10	121	no significant matching		1			
11	268	no significant matching		1			
12	859	Maize retrotransposon		2			
13	200	no ORF		1*		1*	
14	747	Rice defense responsive gene		1		1	
15	367	no significant matching		1	2	3	
16	535	Rice 4-coumarate CoA ligase		1	1		2
<b>17</b>	<b>312</b>	<b>Rice serine/threonine kinase</b>		<b>1*</b>	<b>1</b>	<b>1*</b>	<b>1</b>
18	400	no significant matching			1		
19	297	no significant matching			1		
20	496	Maize unknown function protein			1		
21	369	no significant matching			1		
22	493	Rice unknown function protein			1		
23	419	<i>Arabidopsis</i> RNA cytosine methyltransferase			1	2	
24	226	Rice mRNA cyclopropane fatty acid synthase				1	
25	321	no significant matching				1	
<b>26</b>	<b>376</b>	<b>no significant matching</b>				<b>1</b>	
27	533	no significant matching				1	
28	390	no significant matching				1	
29	436	Tomato unknown function protein				1	
30	402	no significant matching				2	
31	477	Tomato unknown function protein				2	
32	416	<i>Arabidopsis</i> RNA cytosine methyltransferase				2	
<b>33</b>	<b>280</b>	<b>no significant matching</b>				<b>1</b>	<b>1</b>
<b>34</b>	<b>331</b>	<b>no significant matching</b>					<b>1</b>
35	256	no significant matching					1
36	202	Cotton cyclopropane fatty acid synthase					1
37	420	no significant matching					1
38	466	no significant matching					1
39	415	no significant matching					1

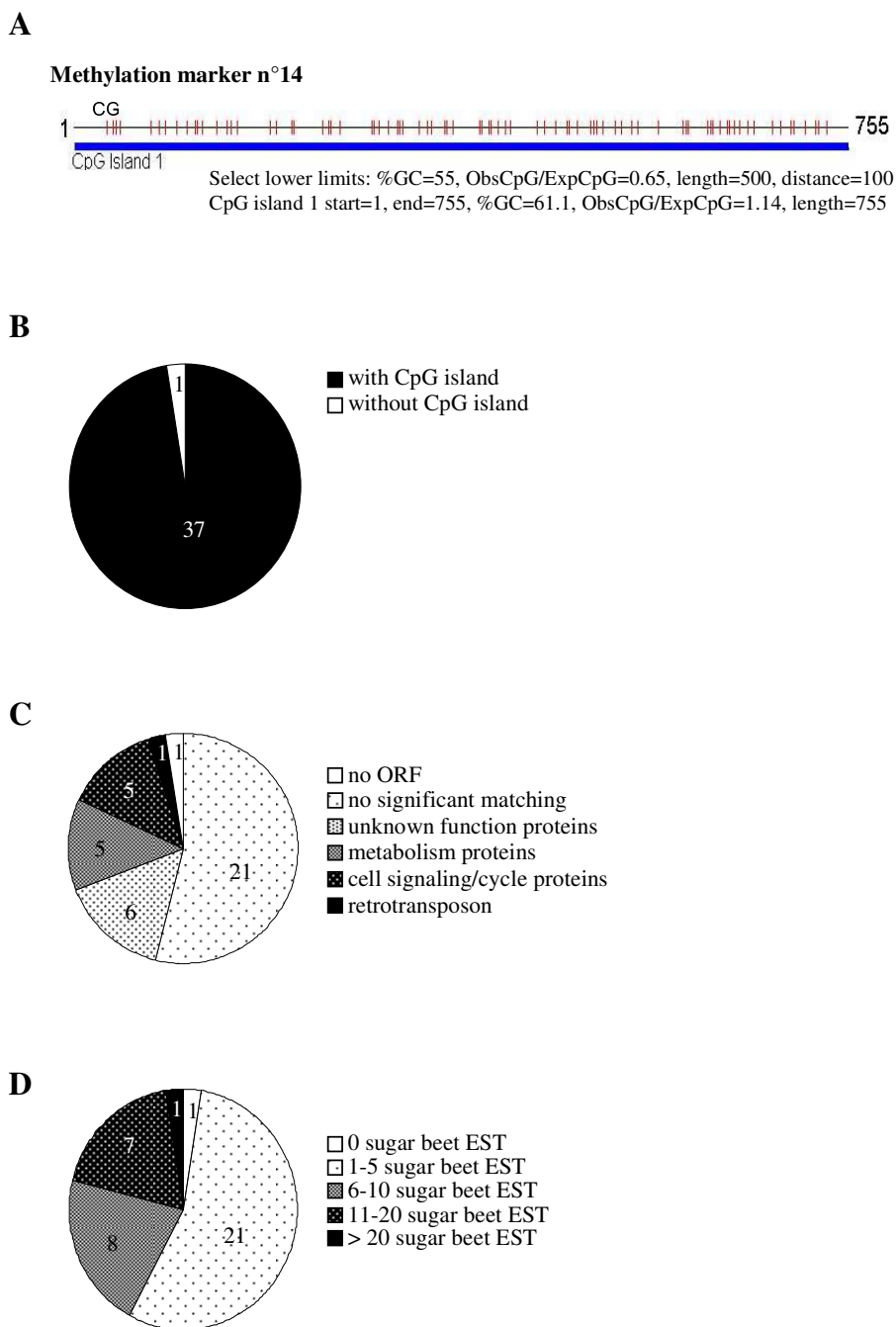
**Table II.** Linear correlations (Pearson's coefficients,  $r$ ) between %mC of RLGS markers sequence, %mC of an unique cytosine in RLGS sequence, global genomic %mC, BD and BI. Correlations were computed at genotype level from two sugarbeet genotypes cultivated during 0, 3 or 12 weeks under a vernalization treatment. Significant correlations are indicated with  $*P \leq 0.05$ .

	Global %mC	BI	BD
<b>Marker 17</b>			
sequence	0.87*		
One cytosine			
<b>Marker 33</b>			
sequence			
Cytosine 10		0.62*	-0.62*
Cytosine 14		0.64*	-0.63*

## Figures

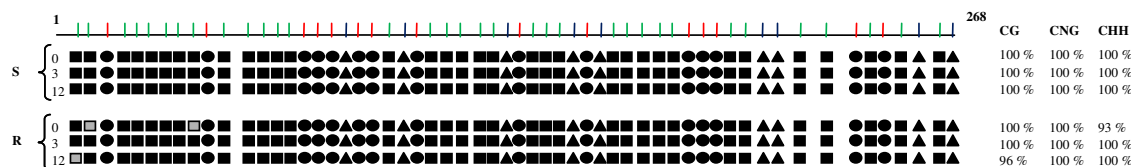


**Figure 1.** Scanning of vernalization-induced epialleles by restriction landmark genome scanning (RLGS) method in sugar beet shoot apex DNA. Longitudinal section of vegetative shoot apex after (A) 3 and (B) 18 weeks of vernalization. DNA was extracted from shoot apex part indicated by dotted line. On RLGS sections obtained with (C; E) 3 weeks and (D; F) 18 weeks of vernalized plants, white arrows indicated methylation markers that can be superposed on the RLGS sections and black arrows indicated methylation marker with different methylation status between the two durations of vernalization.

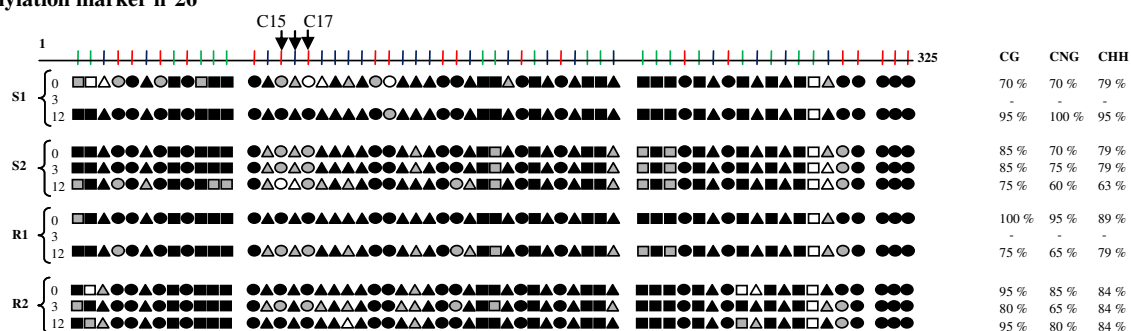


**Figure 2.** Analyses of CpG islands and homologies associated to RLGS methylation markers. (A) Illustration to a CpG island associated to methylation marker and its corresponding characteristics. CG dinucleotides is indicated by vertical red lines and CpG island by horizontal blue line. Charts pie representing the proportion of: (B) methylation markers with or without CpG island, (C) of methylation markers showing homology with distinct proteins, retrotransposon, without ORF and without significant matching after BLAST analysis. (D) of methylation markers matching with different number of sugar beet ESTs.

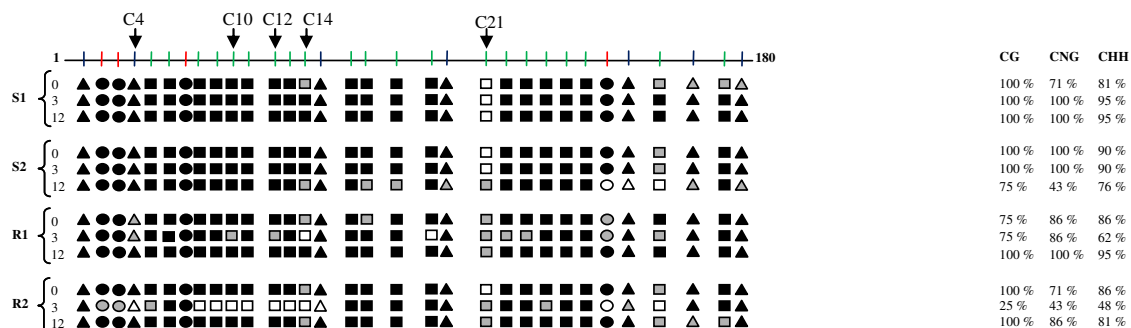
Methylation marker n°17



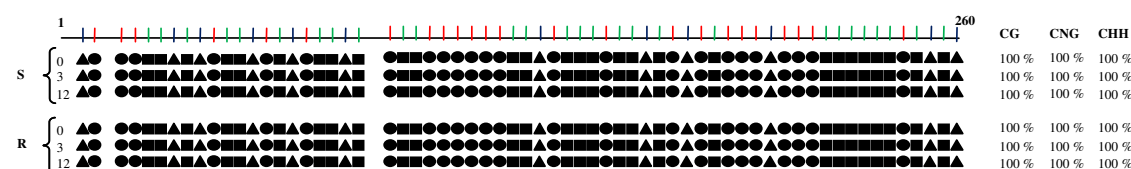
Methylation marker n°26



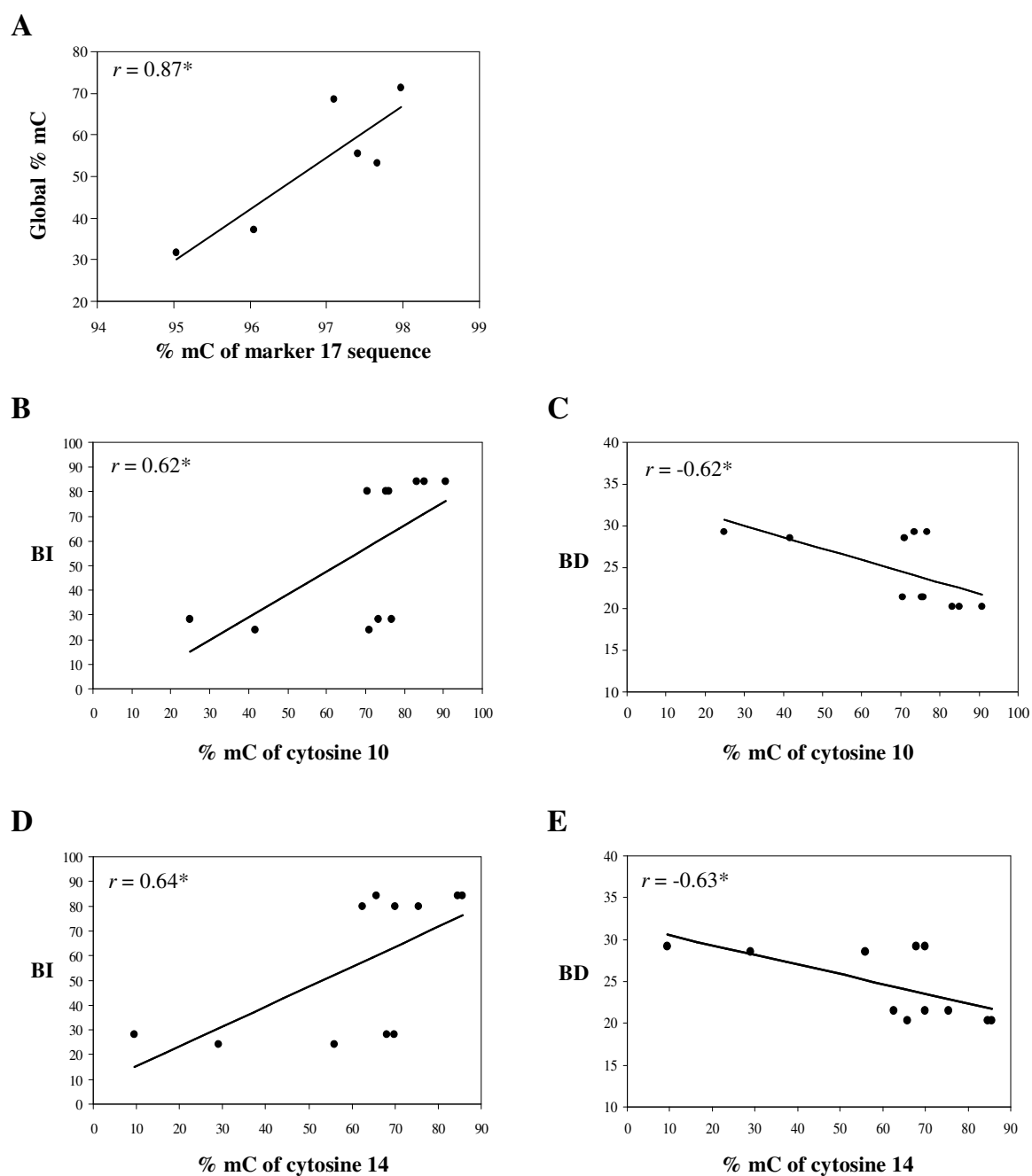
Methylation marker n°33



Methylation marker n°34



**Figure 3.** Methylation pattern analysis of RLGS sequences in bolting sensitive (S) and resistant (R) sugar beet genotypes. Methylation pattern analysis of selected regions of RLGS sequences was performed by bisulfite sequencing. CG, CNG (N = A, T, C or G) and CHH (H = A, T or C) sites in both sequences are shown respectively by circles, triangles and squares. For each sample 240 PCR amplicons were sequenced. A methylcytosine percentage was determined for each cytosine site. Cytosine site was considered to be methylated when % mC was more than 70% (filled circles, triangles or squares). Cytosine site was considered with intermediate state when % mC was comprise between 30 and 70% (grey circles, triangles or squares). Cytosine site was considered as an unmethylated cytosine when %mC was lower than 30% (open circles, triangles or squares). Arrows point to cytosine methylation polymorphism between sensitive and resistant genotypes.



**Figure 4.** Relationship (linear correlation,  $r$ ) between: (A) global %mC and %mC of marker 17 sequence ; (B) %mC of marker 33 cytosine 10 and BI; (C) %mC of marker 33 cytosine 10 and BD respectively; (D) %mC of marker 33 cytosine 14 and BI; (E) %mC of marker 33 cytosine 14 and BD respectively.

## Discussion et perspectives (**Contrat de recherche 44N et thèse CIFRE**).

Notre étude a permis de caractériser, pour la première fois à notre connaissance, des loci cibles du remaniement de la méthylation de l'ADN s'opérant au niveau de l'apex caulinaire de la betterave sucrière lors de la vernalisation. Ces modifications de l'état de méthylation sont caractéristiques d'une durée de traitement vernalisant et peuvent être distinctes chez des génotypes présentant une sensibilité différente à la montaison. Ainsi, 39 séquences différentes ont pu être isolées à l'aide de la méthode dite de "RLGS". Ces séquences possèdent des îlots CpG méthylés associés à des gènes exprimés de fonctions connues ou non. Cependant, parmi toutes ces séquences, certaines pourraient ne pas être directement associées à la vernalisation, mais plutôt participer au remaniement génétique global s'opérant lors du passage à un méristème floral (Sherman et Talbert, 2002 ; Trap-Gentil *et al.*, publication n°4). Ainsi, le criblage de ces séquences, par l'analyse de leur profil de méthylation (voire d'expression ARNm), permet d'identifier des séquences dont l'état d'épiallèles est corrélé à l'induction ou la vitesse de montaison. C'est le cas par exemple du biomarqueur 33. Ces résultats ouvrent des perspectives quant à l'utilisation de ce type de biomarqueur épigénétique dans le cadre de l'amélioration agronomique (Gentil et Maury, 2007). En effet, une telle exploitation existe déjà dans le cadre de tests de détection précoce de certains cancers chez l'Homme (Laird, 2003).

Pour atteindre cet objectif, des études complémentaires devront être effectuées. Les futures principales études (listées ci-dessus) font déjà partie intégrante d'un nouveau contrat de recherche avec SES-VanderHave (44N) et seront réalisées en cours de la thèse Cifre de Mlle Claire Hébrard (01/10/2008-31/09/2011) :

- Terminer le criblage des marqueurs isolés par RLGS. Ce travail est en cours mais il reste plus de la moitié des marqueurs (Stage M2 Clément Lafon-Placette et Thèse Claire Hébrard).
- Réaliser l'analyse de leur profil d'expression par RT-PCR semi-quantitative comme cela a été fait dans la publication n°4 pour les homologues de *VRN2* et *VIN3*.
- Valider les résultats sur un nombre significatif de génotypes (une dizaine ?).
- Réaliser la caractérisation fonctionnelle des loci importants. Pour cela, il est envisageable de synthétiser la protéine recombinante correspondante, d'invalider son expression par transgénèse ou sinon d'étudier, si c'est possible, le mutant



d'*Arabidopsis* correspondant afin de mieux comprendre de rôle de ces protéines dans la vernalisation.

- Notre autre ambition est maintenant de passer de bas débit à moyen/haut débit pour la recherche et la validation de biomarqueurs épigénétiques. De nouveaux outils moléculaires sont apparus récemment (Suzuki et Bird, 2008 ; chapitre 1). Il est donc indispensable de faire progresser notre démarche. En effet, une recherche de marqueurs épigénétiques à plus haut débit est maintenant accessible avec les nouvelles technologies de séquençage haut débit (Technologie Illumina/Solexa ; technologie GS-FLX 454 ou technologie Solid system 7). Cela permettrait de proposer de nombreux marqueurs potentiels et donc d'assurer la possibilité de trouver une combinaison de marqueurs pour l'élaboration d'un test moléculaire de sélection. Nous pourrions alors cribler des biomarqueurs épigénétiques de différents processus biologiques comme la vernalisation, la dévernalisation ou encore l'annualité.

# Conclusion et perspectives

---



# Conclusion et perspectives

---

Chez les plantes, les processus de développement dans son ensemble et de sa plasticité en particulier sont contrôlés par des phénomènes épigénétiques. En particulier, des marques épigénétiques, telles que la méthylation de l'ADN, peuvent présenter un polymorphisme et induire la formation d'épi-allèles. Cependant, aucune recherche de biomarqueurs n'a encore été initiée. Pourtant, le polymorphisme de méthylation de l'ADN peut être une source possible de marqueurs permettant de caractériser des stades de développement, de sélectionner des plantes selon des caractères agronomiques ou d'identifier des génotypes.

Dans cette problématique globale, notre premier objectif a été l'élaboration d'une stratégie pour la mise en évidence d'un contrôle épigénétique lors d'un processus développemental chez une plante, la betterave sucrière en l'occurrence, ainsi que la recherche des biomarqueurs épigénétiques associés. L'application de cette stratégie pour la morphogenèse *in vitro* a été réalisée sur trois lignées cellulaires de betterave sucrière. L'application de traitements modifiant le niveau de différents paramètres épigénétiques telles que la méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones a induit des modifications phénotypiques chez les cultures traitées. En outre, les lignées traitées ou non présentaient des taux de méthylation de l'ADN, d'acétylation des histones, et d'activités enzymatiques correspondantes distincts. Des corrélations statistiques ont pu être établies entre l'état redox de la cellule et les systèmes antioxydants, avec l'état de différenciation des lignées cellulaires mais également avec leurs niveaux de méthylation de l'ADN et d'acétylation des histones. En particulier, une relation négative a pu être établie entre le niveau de méthylation de l'ADN et les propriétés morphogénétiques des lignées. Ces résultats mettent en évidence l'existence d'un contrôle épigénétique de la morphogenèse *in vitro* chez ces lignées cellulaires de betterave sucrière.

Les loci cibles du remaniement de l'état de méthylation de l'ADN s'opérant entre différents états de différenciation cellulaire ont pu être identifiés à l'aide d'une méthode de "scanning" du génome : la RLGS. Ces loci sont majoritairement associés à des îlots CpG et

présentent des homologies avec des protéines de fonctions variées. L'analyse de leur profil de méthylation par la technique de séquençage au bisulfite a montré que certains îlots CpG étaient hyper-méthylés. De plus, une approche gène candidat a également révélé l'existence d'une corrélation entre un polymorphisme de méthylation et une activité enzymatique intervenant dans l'état de différenciation de la cellule. Les perspectives de ce travail sont maintenant de terminer le criblage de des biomarqueurs et de caractériser leurs rôles biologiques. Une collaboration a été initiée à ce sujet avec la société semencière SES-VanderHave dans le cadre d'un contrat de recherche. En particulier, il conviendrait de valider certains marqueurs comme des entités caractéristiques de la morphogenèse végétative et ce, sur plusieurs systèmes expérimentaux d'acquisition de la forme chez la betterave sucrière.

Le deuxième objectif de ce travail de thèse a été la mise en évidence de l'existence d'un contrôle épigénétique lors de la vernalisation et de la dévernalisation chez la betterave sucrière. L'analyse des variations de la méthylation de l'ADN, du ratio d'acétylation des histones et des activités enzymatiques qui leur sont associées avant, pendant et après la (dé)vernalisation, à partir de plusieurs génotypes de betterave sucrière présentant une sensibilité différente à la montaison, a permis d'établir l'existence d'un tel contrôle. Nous suggérons que l'amplitude et la cinétique des variations épigénétiques contrôlent l'induction de la montaison et sa rapidité, permettant ainsi de confirmer le rôle de la méthylation de l'ADN dans ce processus. De plus, nous avons pu établir l'existence d'un polymorphisme épigénétique au niveau du génome ou de séquences spécifiques entre génotypes résistants et sensibles à la montaison. Deux épiallèles de la vernalisation : *BvVNR2* et *BvVIN3* ont pu être identifiés. Un point majeur de nos résultats est que ce polymorphisme est observable chez des plantules âgées de 8 semaines et n'ayant pas encore subi de traitement vernalisant. Ces deux derniers résultats nous ont encouragé à caractériser les loci cibles des remaniements de la méthylation de l'ADN et ceci dans l'objectif d'identifier des biomarqueurs épigénétiques du caractère de résistance à la montaison pour la mise au point d'un test de sélection. Un tel test n'existe pas actuellement. Il nous semble donc essentiel de généraliser l'analyse du profil de méthylation des marqueurs sur un plus grand nombre de génotypes afin de pouvoir les valider comme marqueurs de la montaison. D'un point de vue plus fondamental il serait intéressant de réaliser une analyse comparative de leur profil de méthylation et d'expression afin d'éclaircir le rôle de la méthylation de l'ADN dans la régulation des gènes. Enfin, l'étude du contexte épigénétique, chez des variétés annuelles et la recherche de leurs marqueurs épigénétiques associés, aurait un grand intérêt pour les sélectionneurs qui doivent actuellement tester sur chaque lot de bisannuelles vendu la contamination en annuelles par une méthode empirique.

Le dernier objectif de ce travail de thèse a été de caractériser les loci cibles des remaniements de la méthylation de l'ADN s'opérant au niveau de l'apex caulinaire, lors de la vernalisation, afin d'identifier de potentiels biomarqueurs épigénétiques de la sensibilité à la montaison chez la betterave sucrière. Ainsi, 39 séquences ont pu être isolées par la méthode RLGS. Ces séquences possèdent des îlots CpG méthylés associés à des gènes exprimés de fonctions connues ou non. L'analyse du profil de méthylation de quelques marqueurs a déjà permis d'identifier une séquence (biomarqueur 33) dont l'état d'épiallèles est corrélé à l'induction ou la vitesse de montaison. Ces résultats ouvrent des voies prometteuses quant à l'utilisation de ce type de biomarqueurs épigénétiques dans le cadre de l'amélioration agronomique. Dans l'avenir, il serait d'abord nécessaire de valider les résultats obtenus pour le biomarqueur 33 ou pour d'autres éventuels, en réalisant l'analyse du profil de méthylation sur un nombre significatif de génotypes. L'analyse du profil d'expression des marqueurs, ainsi que la caractérisation fonctionnelle des loci importants pourrait être envisagée. L'invalidation par transgénèse des gènes correspondants et l'étude des mutants associés, renseigneraient sur le rôle des protéines associées. Enfin, il serait souhaitable de passer à un haut débit pour la recherche et la validation de biomarqueurs épigénétiques. En effet, de nouveaux outils moléculaires sont apparus récemment et il est donc indispensable de faire progresser notre démarche. Cela permettrait de proposer un grand nombre de marqueurs potentiels et donc d'assurer la découverte d'une combinaison de marqueurs pour l'élaboration d'un test moléculaire de sélection.

Les travaux effectués au cours de cette thèse, les résultats obtenus et les perspectives évoquées guident actuellement un nouveau travail de thèse au LBLGC en partenariat avec SES-VanderHave afin d'élargir la compréhension des mécanismes épigénétiques connus et d'en découvrir d'autres encore insoupçonnés.



# Valorisation des travaux scientifiques

---

## Publications

**Gentil, M.-V.\***, Causevic, A.\*, Delaunay, A., El-Soud, W.A., Garcia, Z., Pannetier, C., Brignolas, F., Hagège, D. and Maury, S. (2006). Relationship between DNA methylation and histone acetylation levels, cell redox and cell differentiation states in sugarbeet lines. *Planta*. 224: 812-827. (\* co-premiers auteurs).

**Gentil, M.-V.** and Maury, S. (2007). Genomic assisted for crop improvement, Vol I: Genomics approaches and platforms, chapter 16: Characterization of epigenetic biomarkers using new molecular approaches. Tuberosa and Varshney eds. Springer.pp-351-370.

---

## Articles en préparation

**Trap-Gentil, M.-V.**, Lafon-Placette, C., Delaunay, A., Hébrard, C., Brignolas, F., Hagège, D., Joseph, C., Lefebvre, M., Barnes, S and Maury, S. (in preparation). Kinetics and genetic variations of epigenetic marks in vernalized or devernalized sugar beet hybrids with distinct bolting sensitivities.

**Trap-Gentil, M.-V.**, Delaunay, A., Brignolas, F., Hagège, D., Joseph, C., Lefebvre, M., Barnes, S and Maury, S. (in preparation). Characterization of epimutations in vernalized shoot apex of sugar beet hybrids with distinct bolting sensitivities.

---

## Communications

- Présentations orales:

*Apparaît en souligné l'auteur ayant réalisé la présentation*

**Maury, S.**, **Gentil, M.-V.**, Delaunay, A., Joseph, C., Hagège, D., Barnes, S., Lefebvre, M. Looking for epigenetic molecular markers of sugarbeet developmental plasticity using Restriction Genome Scanning (RLGS): a new approach for breeding selection . *Plant Animal and Genome XIV* (January 14-18, 2006- USA, San Diego).

**Gentil, M.-V.**, Causevic, A., Delaunay, A., Gourcilleau, D., Joseph, C., Hagège, D., Brignolas, F. and Maury, S. Characterization of epialleles in relation to plant morphogenesis. VII Colloque National de la Société Française de Biologie Végétale (12-14 Septembre 2007- France, Versailles).

**Gentil, M.-V.**, Causevic, A., Delaunay, A., Gourcilleau, D., Joseph, C., Hagège, D., Brignolas, F. and Maury, S. New Molecular approaches for the research of epigenetic biomarkers of plant morphogenesis. *Plant Genomic European Meeting VI* (October 3-6, 2007- Spain, Tenerife).



- Posters :

**Gentil, M.-V.**, Delaunay, A., Joseph, C., Hagège, D., Barnes, S., Lefebvre, M. and Maury, S. Sélection assistée par marqueurs chez la betterave : rôle de l'épigénétique. Biotechnocentre (3-4 Novembre 2005 - France, Fondjouan).

**Gentil, M.-V.**, **Delaunay, A.**, Joseph, C., Hagège, D. and Maury, S. Stratégies de caractérisation d'épiallèles en vue de leurs utilisations pour la sélection assistée par marqueurs à des fins agronomiques. Biotechnocentre (9-10 Novembre 2006 - France, Seillac).

**Gentil, M.-V.**, Delaunay, A., Joseph, C., Hagège, D., Barnes, S., Lefebvre, M. and Maury, S. (2006). Interest of epigenetic molecular markers obtained by Restriction Landmark Genome Scanning for sugar beet selection. Plant Animal and Genome VI (San Diego).

Maury, S., Gourcilleau, D., **Gentil, M.-V.**, Delaunay, Bogeat-Triboulot, M.-B., Causevic, A., and Brignolas, F. (2007). Developmental plasticity and epigenetic control in response to abiotic stress. Plant Genomic European Meeting (October 3-6, 2007-Spain, Tenerife).

---

## Rencontres avec le partenaire privé SES-VANDERHAVE

Comptes rendus et discussion des résultats obtenus, avec le partenaire privé SES-VanderHave qui finance la majorité des travaux scientifiques.

- Bilan de la première année de thèse – Octobre 2006- Tienen, Belgique
- Bilan de la deuxième année de thèse – Octobre 2007- Tienen, Belgique
- Bilan de la deuxième année de thèse – Octobre 2008- Tienen, Belgique

# Références bibliographiques

---

- Abe T, Matsuyama T, Sekido S, Yamaguchi I, Yoshida S, Kameya T** (2002) Chlorophyll-deficient mutants of Rice demonstrated the deletion of a DNA fragment by heavy-ion irradiation. *Journal of Radiation Research* **43**: 157-161
- Allis C, Jenuwein T, Reinberg D** (2007a) Overview and concepts. In C Allis, T Jenuwein, D Reinberg, eds, *Epigenetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp 23-61
- Allis C, Jenuwein T, Reinberg D** (2007b) *Epigenetics*, In C Allis, T Jenuwein, D Reinberg, eds, *Epigenetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Almouzni G, Clark D, Méchali M, Wolffe A** (1990) Chromatin assembly on replicating DNA in vitro. *Nucleic Acids Res.* **18**: 5767-5774
- Amasino R** (2004) Vernalization, competence, and the epigenetic memory of winter. *Plant Cell* **16**: 2553-2559
- Antequera F, Bird A** (1999) CpG islands as genomic footprints of promoters that are associated with replication origins. *Curr. Biol.* **9**: 661-667
- Antequera F** (2003) Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cell Mol. Life Sci.* **60**: 1647-1658
- Ashikawa I** (2001) Gene-associated CpG islands in plants as revealed by analyses of genomic sequences. *Plant Journal* **26**: 617-625
- Aasland R, Gibson TJ, Steward AF** (1995) The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends in Biochemical Sciences* **20**: 56-59
- Ballestar E, Wolffe A** (2001) Methyl-CpG-binding proteins targeting specific gene repression. *European Journal of Biochemistry* **268**: 1-6
- Bastow R, Mylne JS, Lister C, Lippman Z, Martienssen RS, Dean C** (2004) Vernalization requires epigenetic silencing of *FLC* by histones methylation. *Nature* **427**: 164-167
- Baylin S, Herman J** (2000) DNA hypermethylation in tumorigenesis epigenetics joins genetics. *TIG* **16**: 168-173
- Beck S, Rakyán V** (2008) The methylome: approaches for global DNA methylation profiling. *Trends Genet.* **24**: 213-237
- Beemster G, Fiorani F, Inze D** (2003) Cell cycle: the key to plant growth control? *Trends Plant Science* **8**: 154-158
- Berdasco M, Alcazar R, Garcia-Ortiz M, Ballestar E, Fernandez A, Roldan-Arjona T, Tiburcio A, Altabella T, Buisine N, Quesneville H, Baudri A, Lepiniec L, Alamonos M, Rodriguez**

- R, Lloyd A, Colot V, Bender J, Canal M, M E, Fraga M** (2008) Promoter DNA hypermethylation and gene repression in undifferentiated *Arabidopsis* cells. PLOS 3
- Bestor T** (2000) The DNA methyltransferases of mammals. Hum. Mol. Genet. **9**: 2395-2402
- Bird A** (1978) Use of restriction enzymes to study eukaryote DNA methylation: II The symmetry of methylated sites supports semi-conservative copying of the methylation pattern. Journal of Molecular Biology **118**: 49-60
- Bird A** (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes and Development **16**: 6-21
- Blower M, Karpen G** (2001) The role of Drosophila CID in kinetochore formation, cell-cycle progression and heterochromatin interactions. Nat. Cell Biol. **3**: 730-739
- Boonstra J, Post J** (2004) Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. Genes Cells **337**: 1-13
- Boudry P, Mörchen M, Saumitou-Laprade P, Vernet P, Van Dijk H** (1993) The origin and evolution of weed beets: consequences for the breeding and release of herbicide resistant transgenic sugar beets. Theoretical and applied genetics **87**: 471-478
- Boudry P, Wieber R, Saumitou-Laprade P, Pillen K, Van Dijk H, Jung C** (1994) Identification of RFLP markers closely linked to the bolting gene *B* and their significance for the study of the annual habit in beets (*Beta vulgaris* L.). Theoretical and applied genetics **88**: 852-858
- Boulard M** (2007) Variants d'histones H2BFWT et macroH2A1: de la structure à la fonction génétique. Université Joseph Fourier-Grenoble 1, Grenoble
- Bowman J, Eshed Y** (2000) Formation and maintenance of the shoot apical meristem. Trends in Plant Science **5**: 110-115
- Boyko A, Kovalchuk I** (2007) Epigenetic control of plant stress response. Environmental and molecular mutagenesis **49**: 61-72
- Brock R, Davidson J** (1994) 5-Azacytidine and gamma-rays partially substitute for cold treatment in vernalizing winter-wheat. Environ Exp Bot **34**: 195-199
- Brown R, Strathdee G** (2002) Epigenomics and epigenetics therapy of cancer. Trends in Molecular Medicine **8**: 43-48
- Buchanan B, Gruissem W, Jones R** (2000) Biochemistry and molecular biology of plants, eds American Society of Plant Physiologists.
- Burn J, Bagnall D, Metzger J, Dennis E, Peacock W** (1993) DNA methylation, vernalization and initiation of flowering. PNAS USA **90**: 287-291
- Campbell M, Sederoff R** (1996) Variation in lignin content and composition. Mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants. Plant Physiology **110**: 3-13

- Carles C, Fletcher J** (2003) Shoot apical meristem maintenance: the art of a dynamic balance. *Trends in Plant Science* **8**: 394-401
- Causevic A** (2005) Etude comparative de quelques paramètres du contrôle épigénétique en relation avec le développement de lignées de betterave sucrière. Université d'Orléans, Orléans
- Causevic A, Delaunay A, Ounnar S, Righezza M, Delmotte F, Brignolas F, Hagège D, Maury S** (2005) DNA methylating and demethylating treatments modify phenotype and cell wall differentiation state in sugarbeet cell lines. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**: 681-691
- Causevic A, Gentil M-V, Delaunay A, El Soud W, Garcia Z, Pannetier C, Brignolas F, Hagège D, Maury S** (2006) Relationship between DNA methylation and histone acetylation levels, cell redox and cell differentiation states in sugarbeet lines. *Planta* **224**: 812-827
- Cerrié B, Gaspar T, Greppin H, Penel C** (1994) Redox characteristic of normal and habituated cell lines of sugarbeet. *Plant Cell and Environment* **17**: 457-461
- Chan S-L, Henderson I, Jacobsen S** (2005) Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **6**: 351-360
- Chanvivattana Y, Bishop A, Schubert D, Stock C, Moon Y, Sung Z, Goodrich J** (2004) Interaction of polycomb-group proteins controlling flowering in *Arabidopsis*. *Development* **131**: 5263-5276
- Chaudhuri S, Messing J** (1994) Allele-specific parental imprinting of *dzr1*, a posttranscriptional regulator of zein accumulation. *PNAS USA* **91**: 4867-4871
- Chouard** (1960) Vernalization and its relation to dormancy. *Annu. Rev. Plant Physiol* **11**: 191-238
- Clark S, Harrison J, Frommer M** (1995) CpNpG methylation in mammalian cells. *Nature Genetics* **10**: 20-27
- Clos J, Coumans M, Muller Y** (2002) Le cycle cellulaire chez les animaux et les végétaux. APBG, Paris
- Costello J, Smiraglia D, Plass C** (2002) Restriction landmark genome scanning. *Methods* **27**: 144-149
- Crèvecoeur M, Hagège D, Catesson A, Greppin H, Gaspar T** (1992) Ultrastructural characteristics of cells from normal and habituated sugarbeet calli. *Plant.Physiol.Biochem.* **30**: 87-95
- Crèvecoeur M, Kevers C, Greppin H, Gaspar T** (1987) A comparative biochemical and cytological characterisation of normal and habituated sugarbeet calli. *Biologica Plantarum* **29**: 1-6
- Davuluri R, Grosse I, Zhang M** (2001) Computational identification of promoters and first exons in the human genome. *Nat. Genet.* **29**: 412-417

- Dechat T, Pfliegerhaer K, Sen Gupta K, Shimi T, Shumaker D, Solimando L, Goldman R** (2008) Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes and Development* **22**: 832-853
- Dennis ES, Peacock WJ** (2007) Epigenetic regulation of flowering. *Current Opinion in Plant Biology* **2007**: 1-8
- Dobosy J, Selker E** (2001) Emerging connections between DNA methylation and histone acetylation. *Cellular and Molecular Life Sciences* **58**: 721-727
- Down T, Hubbard T** (2002) Computational detection and location of transcription start sites in mammalian genomic DNA. *Genome Res.* **12**: 458-461
- Dupont J** (2006) Architecture de la chromatine dans le noyau interphasique. In. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.*
- Edreva A** (2005) Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **106**: 119-133
- Exner V, Henning L** (2008) Chromatin rearrangements in development. *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 64-69
- Farrona S, Coupland G, Turck F** (2008) The impact of chromatin regulation of the floral transition. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **19**: 560-573
- Fieldes MA, Schaeffer SM, Krech MJ, Brown JCL** (2005) DNA hypomethylation in 5-azacytidine-induced early-flowering lines of flax. *Theor. Appl. Genet.* **111**: 136-149
- Finnegan E, Dennis E** (1993) Isolation and identification by sequence homology of a putative cytosine methyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Nucl. Acids Res.* **21**: 2383-2388
- Finnegan E, Peacock W, Dennis E** (1996) Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *PNAS USA* **93**: 8449-8454
- Finnegan E, Genger R, Kovac K, Peacock W, Dennis E** (1998) DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization. *PNAS USA* **95**: 5824-5829
- Finnegan E, Kovac K** (2000) Plant DNA methyltransferases. *Plant Molecular Biology* **43**: 189-201
- Finnegan EJ** (2001) Epialleles: a source of random variation in time of stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 1001-1006
- Finnegan EJ, Kovac KA, Jaligot E, Sheldon CC, Peacock WJ, Dennis ES** (2005) The downregulation of *FLOWERING LOCUS C (FLC)* expression in plants with low levels of DNA methylation and by vernalization occurs by distinct mechanisms. *The Plant Journal* **44**: 420-432
- Finnegan EJ, Dennis ES** (2007) Vernalization-induced trimethylation of histone H3 lysine 27 at *FLC* is not maintained in mitotically quiescent cells. *Current Biology* **17**: 1-6

- Fraga M, Rodriguez R, Canal M** (2002) Genomic DNA methylation-demethylation during aging and reinvigoration of *Pinus radiata*. *Tree Physiology* **22**: 813-816
- Fransz P, De Jong J** (2002) Chromatin dynamics in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 560-567
- Frühwald M, Plass C** (2002) Global and gene-specific methylation patterns in cancer: Aspects of tumour biology and clinical potential. *Molecular Genetics and Metabolism* **75**: 1-6
- Fuks F, Burgers W, Brehm A, Hughes-Davies L, Kouzarides T** (2000) DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nature Genetics* **24**: 88-91
- Fuks F, Hurd P, Wolf D, Nan X, Bird A** (2003) The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 4035-4040
- Galaud J, Gaspar Ta, Boyer N** (1993) Effect of anti-DNA methylation drugs on growth, level of methylated DNA, peroxidase activity and ethylene production of *Bryonia dioica* internodes. *Physiologia Plantarum* **87**: 528-534
- Garcia B, Busby S, Barber C, Shabanowitz J, Allis C, Hunt D** (2004) Characterization of phosphorylation sites on histone H1 isoforms by tandem mass spectrometry. *Journal of Proteome Research* **3**: 1219-1227
- Gaspar T, Kevers C, Penel C, Crèvecoeur M, Greppin H** (1988) Biochemical characterization of normal and habituated sugarbeet calli. Relationship with anatomy, habituation and organogenesis. *Postdamer Forschung*. B57: 20-30
- Gendall AR, Levy YY, Wilson A, Dean C** (2001) The *VERNALIZATION 2* gene mediates the epigenetic regulation of vernalization in *Arabidopsis*.
- Gendrel A, Lippman Z, Yordan C, Colot V, Martienssen R** (2002) Dependence of heterochromatic histone H3 methylation patterns on the *Arabidopsis* gene *DDM1*. *Science* **297**: 1871-1873
- Genger RK, Peacock WJ, Dennis ES, Finnegan EJ** (2003) Opposing effects of reduced DNA methylation on flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **216**: 461-466
- Gentil M-V, Maury S** (2007) Characterization of epigenetic biomarkers using new molecular approaches. In R Varshney, R Tuberosa, eds, *Genomic assisted crop improvement, Vol 1: Genomic approaches and platforms*. Springer, pp 351-370
- Gonzalez L, Rojas C, Perez J** (1999) Diferulate and lignin formation is related to biochemical differences of wall-bound peroxidases. *Phytochemistry* **50**: 711-717
- Gonzalez L, Rojas M** (1999) Role of wall peroxidases in oat growth inhibition by DIMBOA. *Phytochemistry* **50**: 931-937

- Goodrich J, Tweedie S** (2002) Remembrance of things past: chromatin remodeling in plant development. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **18**: 707-746
- Grant-Downton RT, Dickinson HG** (2005) Epigenetics and its Implications for Plant Biology.1. The epigenetic network in plants. *Annals of Botany* **96**: 1143-1164
- Gregory BD, Yazaki J, Ecker JR** (2008) Utilizing tiling microarrays for whole-genome analysis in plants. *The plant journal* **53**: 636-644
- Grewal S, Elgin S** (2007) Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature* **447**: 399-406
- Gruenbaum Y, Naveh-Many T, Cedar H, Razin A** (1981) Sequence specificity of methylation in higher plant DNA. *Nature* **292**: 860-862
- Guitton A, Page D, Chambrier P, Lionnet C, Faure J, Grossniklaus U, Berger F** (2004) Identification of new members of fertilisation independent seed polycomb group pathway involved in the control of seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **131**: 2971-2981
- Hagège D, Kevers C, Duyme M, Boucaud J, Gaspar T** (1990) Polyamines, phospholipids and hydroperoxides in normal and habituated sugarbeet calli. *J. Plant Physiol.* **136**: 641-645
- Hagège D, Kevers C, Crevecoeur M, Tollier M, Monties B, Gaspar T** (1991a) Peroxidases, growth and differentiation of habituated sugarbeet cells. In HG J. Lobarzewski, C. Penel, T. Gaspar, eds, ed, *Biochemical Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidase*, Geneve, Switzerland, pp 281-290
- Hagège D, Kevers C, Gaspar T** (1991b) A comparison between ethylene production, ACC and mACC contents and hydroperoxyde level in normal and habituated sugarbeet calli. *Physiologia Plantarum* **82**: 397-400
- Hagège D, Kevers C, Gaspar T** (1991c) Abnormal growth of habituated sugarbeet callus and cell suspension. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* **27**: 112-116
- Hagège D, Kevers C, Salabert P, Gaspar T** (1992) Protective systems against activated oxygen species compared in normal and fully habituated non-organogenic sugarbeet calluses. *In Vitro Cell Developmental Biology* **28**: 143-147
- Hagège D** (1996) Habituation in sugarbeet plant cells: permanent stress or antioxidant adaptive strategy? *In Vitro Cell Developmental Biology* **32**: 1-5
- Hagège D** (2004) Les photorécepteurs des plantes. In *Bulletin pédagogique trimestriel 3-2004*, ed, Biologie, Géologie. APBG, Paris
- Hark A, Schoenherr C, Katz D, Ingram R, Levorse J, Tilghman S** (2000) CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the *H19/Igf2* locus. *Nature* **405**: 486-489

- Hasler J, Wuest J, Gaspar T, Crevecoeur M** (2003) Long term in vitro-cultured plant cells show typical neoplastic features at the cytological level. *Biol Cell* **95**: 357-364
- Heitz E** (1928) Das heterochromatin der moose. *I. Jahrb. Wiss. Bot.* **69**: 762-818
- Henderson IR, Jacobsen SE** (2007) Epigenetic inheritance in plants. *Nature* **447**: 418-424
- Henikoff S, Ahmad K** (2005) Assembly of variant histones into chromatin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**: 133-153
- Henikoff S, Comai L** (1998) A DNA methyltransferase homolog with a chromodomain exists in multiple polymorphic forms in Arabidopsis. *Genetics* **149**: 307-318
- Henikoff S, Dalal Y** (2005) Centromeric chromatin: what makes it unique? *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**: 177-184
- Holliday R** (1990) DNA methylation and epigenetic inheritance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **326**: 329-338
- Holstege F, Jennings E, Wyrick J, Lee T, Hengartner C, Green M, Golub T, Lander E, Young R** (1998) Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell* **95**: 717-728
- Horvath D, Anderson J, Chao W, Foley M** (2003) Knowing when to grow: signals regulating bud dormancy. *Trends in Plant Science* **11**: 534-540
- Hung M, Shen C** (2003) Eukaryotic methyl-CpG-binding domain proteins and chromatin modification. *Eukaryot. Cell* **2**: 841-846
- Ioshikhes I, Zhang M** (2000) Large-scale human promoter mapping using CpG islands. *Nat. Genet.* **26**: 61-63
- Izban M, Luse D** (1991) Transcription on nucleosomal templates by RNA polymerase II in vitro: inhibition of elongation with enhancement of sequence-specific pausing. *Genes Dev.* **5**: 683-696
- Jackson J, Lindroth A, Cao X, Jacobsen S** (2002) Control of CpNpG DNA methylation by the kryptonite histone H3 methyltransferase. *Nature* **416**: 556-560
- Jeddeloh J, Bender J, Richards E** (1998) The DNA methylation locus DDM1 is required for maintenance of gene silencing in Arabidopsis. *Genes Dev.* **12**: 1714-1725
- Jeppesen P, Turner B** (1993) The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell* **74**: 281-289
- Jia D, Jurkowska R, Zhang X, Jeltsch A, Cheng X** (2007) Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. *Nature* **449**: 248-251
- Johanson U, West J, Lister C, Michaels S, Amasino R, Dean C** (2000) Molecular analysis of *frigida*, a major determinant of natural variation in Arabidopsis flowering time. *Science* **290**: 253-254



- Jones P** (1999) The DNA methylation paradox. *Trends Genet.* **15**: 34-37
- Jones P, Takai D** (2001) The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* **293**: 1068-1070
- Joseph C, Billot J, Côme D** (1982) Mise en évidence d'un facteur d'inhibition racinaire de la floraison de *Cichorium intybus* L. et levée de cette inhibition par le froid. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences* **295**: 417-420
- Joyce S, Cassells A, Jain S** (2003) Stress and aberrant phenotypes in in vitro culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **74**: 103-121
- Kaeppler S, Kaeppler H, Rhee Y** (2000) Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology* **43**: 179-188
- Kakutani T** (1997) Genetic characterization of late-flowering traits induced by DNA hypomethylation mutation in *Arabidopsis thaliana*. *The plant journal* **12**: 1447-1451
- Karpen G, Allshire R** (1997) The case for epigenetic effects on centromere identity and function. *Trends Genet.* **13**: 489-496
- Katz A, Oliva M, Mosquna A, Hakim O, Ohad N** (2004) FIE and CURLY LEAF polycomb proteins interact in the regulation of homeobox gene expression during sporophyte development. *Plant Journal* **37**: 707-719
- Khorasanizadeh S** (2004) The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* **116**: 259-272
- Kinoshita Y, Saze H, Kinoshita T, Miura A, Soppe W, Koornneef M, Kakutani T** (2007) Control of FWA gene silencing in *Arabidopsis thaliana* by SINE-related direct repeats. *The Plant Journal.* **49**: 38-45
- Kishimoto N, Sakai H, Jackson J, Jacobsen S, Meyerowitz E, Dennis E, Finnegan E** (2001) Site specific of the *Arabidopsis* MET1 DNA methyltransferase demonstrated through hypermethylation of the superman locus. *Plant Molecular Biology* **46**: 171-183
- Klose R, Zhang Y** (2007) Histone H3 Arg2 methylation provides alternative directions for compass. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**: 1058-1060
- Koornneef M, Alonso-Blanco C, Peeters AJM, Soppe W** (1998) Genetic control of flowering time in *Arabidopsis*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 345-370
- Kouzarides T** (2002) Histone methylation in transcriptional control. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**: 198-209
- Laird P** (2003) The power and the promise of DNA methylation markers. *Nature* **3**: 253-264

- Lambé P, Mutambel H, Fouche J, Deltour R, Foidart J, Gaspar T** (1997) DNA methylation as a key process in regulation of organogenic totipotency and plant neoplastic progression? In *Vitro Cell Dev. Biol.-Plant* **33**: 155-162
- Lang A** (1957) The effects of gibberellin upon flower formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **43**: 709-717
- Lang A** (1965) Physiology of flower initiation. In *Encyclopedia of plant physiology*, ed, Rushland, W. Springer, Berlin, pp 1489-1536
- Levine S, King I, Kingston R** (2004) Division of labor in polycomb group repression. *Trends in Biochemical Sciences* **29**: 478-485
- Lexander** (1980) Present knowledge of sugar beet bolting mechanisms. *In* Proceeding of the 43rd winter congress of the international institute of sugar beet research. Institut international de recherche bettravières, Brussels, pp 245-258
- Li G, Chandrasekharan M, Wolffe A, Hall T** (2001) Chromatin structure and phaseolin gene regulation. *Plant Mol. Biol.* **46**: 121-129
- Li G, Hall T, Holmes-Davis R** (2002) Plant chromatin: development and gene control. *BioEssays* **24**: 234-243
- Lippman Z, Gendrel A-V, Colot V, and Martienssen R** (2005) Profiling DNA methylation patterns using genomic tiling microarrays. *Nature Methods* **2**: 219-224
- Litt MD, Simpson M, Gaszner M, Allis C, Felsenfeld G** (2001) Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus. *Science* **293**: 2453-2455
- Liu L, Wyle R, Andrews L, Tollefsbol T** (2003) Aging, cancer and nutrition: the DNA methylation connection. *Mechanism of Ageing and Development* **124**: 989-998
- Liu Z, Oughtred R, Wing S** (2005) Characterization of E3Histone, a novel testis ubiquitin protein ligase which ubiquitinates histones. *Mol. Cell. Biol.* **25**: 2819-2831
- Lodish H, Berk A, Zipursky LS, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J**, eds (2000) *Molecular Cell Biology* Fourth Edition New York
- LoSchiavo F, Pitto L, Giuliano G, Torti G, V N-R, Marazziti D, Vergara R, Orselli S, Terzi M** (1989) DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theor. Appl. Genet.* **77**: 325-331
- Luger K** (2003) Structure and dynamic behaviour of nucleosome. *Current Opinion in Genetics & Development* **13**: 127-135
- Luger K** (2006) Dynamic nucleosomes. *Chromosome Research* **14**: 5-16

- Luger K, Mader A, Richmond R, Sargent D, Richmond T** (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**: 251-260
- Lukens L, Zhan S** (2007) The plant genome's methylation status and response to stress: implications for plant improvement. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 317-322
- Lusser A, Kadonaga J** (2003) Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *Bioessays* **25**: 1192-1200
- MacAdam J, Grabber J** (2002) Relationship of growth cessation with the formation of diferulate cross-links and p-coumaroylated lignins in tall fescue leaf blades. *Planta* **215**: 785-793
- Malik H, Henikoff S** (2003) Phylogenomics of nucleosome. *Nat. Struct. Biol.* **10**: 882-891
- Martienssen R, Colot V** (2001) DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. *Science* **293**: 1070-1074
- Martin C, Zhang Y** (2005) The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**: 838-849
- Mathieu O, Reinders J, Caikovski M, Smathajitt C, Paszkowski J** (2007) Transgenerational stability of the Arabidopsis epigenome is coordinated by CG methylation. *Cell* **130**: 851-862
- Matsuyama T, Kimura M, Koike K, Abe T, Nakano T, Asami T, Ebisuzaki T, Held W, Yoshida S, Nagase H** (2003) Global methylation screening in the Arabidopsis thaliana and Mus musculus genome: applications of virtual image restriction landmark genomic scanning (Vi-RLGS). *Nucleic Acids Research* **31**: 4490-4496
- Matzke M, Schied O** (2007) Epigenetic regulation in plants. In C Allis, T Jenuwein, D Reinberg, eds, *Epigenetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp 167-187
- Matzke M, Schied O** (2007) Epigenetic regulation in plants. In C Allis, T Jenuwein, D Reinberg, eds, *Epigenetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp 167-187
- Mayama T, Ohtsubo E, Tsuchimoto S** (2003) Isolation and expression analysis of petunia CURLY LEAF-like genes. *Plant Cell Physiology* **44**: 811-819
- McClintock B** (1951) Chromosome organization and genic expression. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **16**: 13-47
- Metzger JD** (1988) Localization of the site of perception of thermoinductive temperatures in *Thlaspi arvense* L. *Plant Physiology* **88**: 424-42
- Meyer P** (2000) Transcriptional transgene silencing and chromatin components. *Plant Mol. Biol.* **43**: 211-234
- Meyer P** (2001) Chromatin remodelling. *Current Opinion in Plant Biology* **4**: 457-462
- Michaels S, Amasino R** (1999) FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant cell* **11**: 949-956

- Michaels S, Amasino R** (2001) Loss of FLOWERING LOCUS C activity eliminates the late-flowering phenotype of FRIGIDA and autonomous pathway mutations but not responsiveness to vernalization. *Plant Cell* **13**: 935-941
- Mittler R** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**: 405-410
- Musel G, Schindler T, Bergfeld R, Ruel K, Jacquet G, Lapierre C, Speth V, Schopfer P** (1997) Structure and distribution of lignin in primary and secondary cell walls of maize coleoptiles analyzed by chemical and immunological probes. *Planta* **201**: 146-159
- Mutasa-Gottgens E, Qi A, Mathews A, Thomas S, Phillips A, Hedden P** (2009) Modification of gibberellin signalling (metabolism & signal transduction) in sugar beet: analysis of potential targets for crop improvement. *Transgenic Research* **18**: 301-308
- Mylne JS, Barrett L, Tessadori F, Mesnage S, Johnson L, Bernatavichute YV, Jacobsen SE, Fransz P, Dean C** (2006) LHP1, the *Arabidopsis* homologue of HETEROCHROMATIN PROTEIN1, is required for epigenetic silencing of *FLC*. *PNAS* **103**: 5012-5017
- Nagaki K, Cheng Z, Ouyang S, Talbert P, Kim M, Jones K, Henikoff S, Buell C, Jiang J** (2004) Sequencing of a rice centromere uncovers active genes. *Nat. Genet.* **36**: 138-145
- Nakabayashi K, Okamoto M, Koshiba T, Kamiya Y, Nambara E** (2005) Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination. *The plant journal* **41**: 697-709
- Nan X, Ng H, Johnson C, Laherty C, Turner B, Eisenman R, Bird A** (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393**: 386-389
- Narlikar G, Fan H, Robert Kingston E** (2002) Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* **108**: 475-487
- Ng H, Bird A** (1999) DNA methylation and chromatin modification. *Current Opinion in Genetic and Development* **9**: 158-163
- Ohler U, Niemann H, Liao G, Rubin G** (2001) Joint modeling of DNA sequence and physical properties to improve eukaryotic promoter recognition. *Bioinformatics* **17**: 199-206
- Ortega-Galisteo A, Morales-Ruiz T, Ariza R, Roldan-Arjona T** (2008) *Arabidopsis* DEMETER-LIKE proteins DML2 and DML3 are required for appropriate distribution of DNA methylation marks. *Plant Molecular Biology* **67**: 671-681
- Owen FV** (1954) The significance of single gene reactions in sugar beets. *Proc. Am. Soc. Sugar Beet Technologists* **8**: 392-398

- Palmer D, O'Day K, Wener M, Andrews B, Margolis R** (1987) A 17-kD centromere protein (CENP-A) copurifies with nucleosome core particles and with histones. *J. Cell. Biol.* **104**: 805-815
- Pandey N, Marzluff W** (1987) The stem-loop structure at the 3' end of histone mRNA is necessary and sufficient for regulation of histone mRNA stability. *Mol. Cell Biol.* **7**: 4557-4559
- Pavlopoulou A, Kossida S** (2007) Plant cytosine-5 DNA methyltransferases: structure, function and molecular evolution. *Genomics* **90**: 530-541
- Penterman J, Zilberman D, Huh J, Ballinger T, Henikoff S, Fischer R** (2007) DNA demethylation in the Arabidopsis genome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**: 6752-6757
- Perarnaud V, Souverain F, Prats S, Dequiedt B, Fauchère J, Richard-Molard M** (2001) Influence du climat sur le phénomène de montée à graine de la betterave. *In*. ITB, pp 1-13
- Pfeifer G, Steigerwals S, Grunwals S** (1989) The DNA methylation system in proliferating and differentiated cells. *Cell Biophys* **15**: 79-86
- Pfluger J, Wagner D** (2007) Histone modifications and dynamic regulation of genome accessibility in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**: 645-652
- Pigliucci M** (2001) Phenotypic plasticity: beyond nature and nurture. Johns Hopkins University Press
- Ponger L, Mouchiroud D** (2002) CpGProD: identifying CpG islands associated with transcription start sites in large genomic mammalian sequences. *Bioinformatics* **18**: 631-633
- Purvis ON, Gregory FG** (1937) Studies in vernalization of cereals. I. A comparative study of vernalization of winter rye by low temperature and by short days. *Annals of Botany* **1**: 569-591
- Purvis ON, Gregory FG** (1952) Studies in vernalization of cereals. XII. The reversibility by high temperature of the vernalized conditions in Petkus winter rye. *Annals of Botany* **1**: 569-592
- Qiu J** (2006) Unfinished symphony. *Nature* **441**: 143-145
- Razin A** (1998) CpG methylation, chromatin structure and gene silencing: a three-way connection. *EMBO* **17**: 4905-4908
- Razin A, Shemer R** (1995) DNA methylation in early development. *Human Mol. Gen.* **4**: 1751-1755
- Reeves PA, He Y, Schmitz RJ, Amasino RM, Panella LW, Richards CM** (2007) Evolutionary conservation of the *FLOWERING LOCUS C*-mediated vernalization response: evidence from the sugar beet (*Beta vulgaris*). *Genetics* **176**: 295-307
- Reyes J** (2006) Chromatin modifiers that control plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 21-27
- Richards E** (1997) DNA methylation and plant development. *Trends in Genetic* **13**: 319-323

- Richards E, Elgin S** (2002) Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing rounding up the usual suspects. *Cell* **108**: 489-500
- Robertson K, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, Wade P, Jones P, Wolffe A** (2000) DNMT1 forms a complex with Rb, E2F2 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nature Genetics* **25**: 338-342
- Ronemus M, Galbiati M, Ticknor C, Chen J, Dellaporta S** (1996) Demethylation-induced developmental pleiotropy in *Arabidopsis*. *Science* **273**: 654-657
- Rountree M, Bachman K, Baylin S** (2000) DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1 to form a complex at replication foci. *Nature Genetics* **25**: 269-277
- Ruiz-Herrera J** (1994) Polyamines, DNA methylation and fungal differentiation. *Crit Rev Microbiol* **20**: 143-150
- Rush L, Plass C** (2002) Restriction landmark genomic scanning for DNA methylation in cancer: past, present, and future applications. *Analytical biochemistry* **307**: 191-201
- Russell L** (1963) Mammalian X-chromosome action: inactivation limited in spread and in region of origin. *Science* **140**: 976-978
- Salzberg S, Fisher O, Siman-Tov R, Ankri S** (2004) Identification of Methylated Sequences in Genomic DNA of Adult *Drosophila melanogaster* genome assembly archive: a new public resource. *Biochem. Bioph. Res. Com.* **322**: 465-469
- Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J** (2001) Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cellular and Physiological Biochemistry* **11**: 173-186
- Schöb H, Grossniklaus U** (2006) The first high-resolution DNA "methylome". *Cell* **126**: 1025-1028
- Schopfer P** (2001) Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening in vitro and in vivo: implications for the control of elongation growth. *Plant Journal* **28**: 679-688
- Schwabe WW** (1954) Factors controlling flowering in the *Chrysanthemum* IV. The site of vernalisation and translocation of the stimulus. *J. Exp. Bot* **5**: 389-400
- Schwartz B, Ahmad K** (2005) Transcriptional activation triggers deposition and removal of the histone variant H3.3. *Genes and development* **19**: 804-814
- Searle I, He Y, Turck F, Vincent C, Fornara F, Kröber S, Amasino RA, Coupland G** (2006) The transcription factor *FLC* confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes & Development* **20**: 898-912
- Shao** (1999) Probing nanometer structures with atomic force microscopy. *News in Physiological Sciences* **14**: 142-149

- Sheldon C, Finnegan E, Rouse D, Tadege M, Bagnall D, Helliwell C, Peacock W, Dennis E** (2000a) The control of flowering by vernalization. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 418-422
- Sheldon C, Rouse D, Finnegan E, Peacock W, Dennis E** (2000b) The molecular basis of vernalization: the central role of *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 3753-3758
- Shen W** (2002) The plant E2F-Rb pathway and epigenetic control. *Trends Plant Sci.* **7**: 505-511
- Sherman J, Talbert L** (2002) Vernalization-induced changes of the DNA methylation pattern in winter wheat. *Genome* **45**: 253-260
- Smit AL** (1983) Influence of external factors on growth and development of sugar-beet (*Beta vulgaris* L.). Agricultural Research Reports, PUDOC
- Smith S, Stillman B** (1991) Stepwise assembly of chromatin during DNA replication in vitro. *EMBO J.* **10**: 971-980
- Srivastava L** (2001) Plant growth and development: hormones and environment. Academic Press, USA
- Steward N, Kusano T, Sano H** (2000) Expression of *ZmMET1*, a gene encoding a DNA methyltransferase from maize, is associated not only with DNA replication in actively proliferating cells, but also with altered DNA methylation status in cold stressed quiescent cells. *Nucleic Acids Research* **28**: 3250-3259
- Stout M** (1945) Translocation of the reproductive stimulus in sugar beets. *Bot. Gaz.* **107**: 86-95
- Sullivan J, Deng X** (2003) From seed to seed: the role of photoreceptors in Arabidopsis development. *Developmental Biology* **260**: 289-297
- Sung S, Amasino R** (2004a) Vernalization and epigenetics: how plants remember winter. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 4-10
- Sung S, Amasino R** (2004b) Vernalization in *Arabidopsis thaliana* is mediated by the PHD finger protein VIN3. *Nature* **427**: 159-164
- Sung S, He Y, Eshoo TW, Tamada Y, Johnson L, Nakahigashi K, Goto K, Jacobsen SE, Amasino RM** (2006) Epigenetic maintenance of the vernalized state in *Arabidopsis thaliana* requires LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1. *Nature Genetics* **38**: 706-710
- Suzuki M, Bird A** (2008) DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat. Rev. Genet.* **9**: 465-476
- Taiz L, Zeiger E** (2006) *Plant Physiology*, Ed 4th edition. Sinauer Associates, Sunderland
- Takai D, Jones P** (2002) Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *PNAS USA* **99**: 3740-3745

- Takamiya T, Hosobuchi S, Asai K, Nakamura E, Tomioka K, Kawase M, Kakutani T, Paterson A, Murakami Y, Okuizumi H** (2006) Restriction landmark genome scanning method using Isoschizomers (MspI/HpaII) for DNA methylation analysis. *Electrophoresis* **27**
- Tamaru H, Selker E** (2001) A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* **414**: 277-283
- Tatematsu K, Yamazaki T, Ishikawa F** (2000) MBD2-MBD3 complex binds to hemimethylated DNA and forms a complex containing DNMT1 at the replication foci in late S phase. *Genes Cells* **5**: 677-688
- Taverna S, Coyne R, Allis C** (2002) Methylation of histone h3 at lysine 9 targets programmed DNA elimination in tetrahymena. *Cell* **110**: 701-711
- Thomas B, Vince-Prue D**, (1984) Juvenility, photoperiodism and vernalization. M.B. Wilkins, Pirman eds., London.
- Thomashow MF** (2001) So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! *Plant Physiology* **125**: 89-93
- Trap-Gentil M-V, Delaunay A, Brignolas F, Haguère D, Joseph C, Lefebvre M, Barnes S, Maury S** (in preparation) Characterization of epimutations in vernalized shoot apex of sugar beet hybrids with distinct bolting sensitivities.
- Trap-Gentil M-V, Lafon-Placette C, Delaunay A, Hébrard C, Brignolas F, Haguère D, Joseph C, Lefebvre M, Barnes S, Maury S** (Submitted) Kinetics and genetic variations of epigenetic marks in vernalized or devernalized sugar beet hybrids with distinct bolting sensitivities.
- Turck F, Fornara F, Coupland G** (2008) Regulation and identity of Florigen: FLOWERING LOCUS T moves center stages. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 573-594
- Turner B** (2001) Chromatin and gene regulation. *Molecular mechanisms in epigenetics*,
- Turner B** (2002) Cellular memory and the histone code. *Cell* **111**: 285-291
- Turner B** (2005) Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for modified histones. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**: 110-112
- Vanyushin BF, Bakeeva LE, Zamyatnina VA, Alekasndrushkina NI** (2004) Apoptosis in plants: specific features of plant apoptotic cells and effect of various factors and agents. *International Review in Cytology* **233**: 135-179
- Varga-Weisz P, Becker P** (1998) Chromatin-remodeling factors: machines that regulate? *Current Opinion in Cellular Biology* **10**: 346-353
- Vaucheret H, Fagard M** (2001) Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends Genet.* **17**: 29-35



- Vaute O, Nicolas E, Vandel L, Trouche D** (2002) Functional and physical interaction between the histone methyl transferase Suv39H1 and histone deacetylases. *Nucleic Acids Res.* **30**: 475-481
- Verbsky M, Richards E** (2001) Chromatin remodeling in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**: 494-500
- Verschure P, Visser A, Rots M** (2006) Step out of the groove: epigenetic gene control systems and engineered transcription factors. *Adv. Genet.* **56**: 163-204
- Von Aderkas P, Bonga J** (2000) Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. *Tree Physiol.* **20**: 921-928
- Vong A, Kakutani T, Martienssen R, Richards E** (1993) *Arabidopsis thaliana* DNA methylation mutants. *Science* **260**: 1926-1928
- Waddington C** (1942) The epigenotype. *Endeavour* **1**: 18-20
- Waddington C** (1957) *The strategy of the genes*, New York
- Wade P, Geggion A, Jones P, Ballestar E, Aubry F, Wolffe A** (1999) Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nature Genetics* **23**: 62-66
- Wagner D** (2003) Chromatin regulation of plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 20-28
- Wassenegger M** (2005) The role of the RNAi machinery in heterochromatin formation. *Cell* **122**: 13-16
- Watanabe S, Ichimura T, Fujita N, Tsuruzoe S, Ohki I, Shirakawa M, Kawasuji M, Nakao M** (2003) Methylated DNA-binding domain 1 and methylpurine-DNA glycosylase link transcriptional repression and DNA repair in chromatin. *PNAS USA* **28**: 12859-12864
- Weigel D, Jürgens G** (2002) Stem cells that make stems. *Nature* **415**: 751-754
- Wellensiek SJ** (1964) Dividing cells as the prerequisite for vernalization. *Plant Physiology* **39**: 832-835
- Wolffe A, Matzke M** (1999) Epigenetics: regulation through repression. *Science* **286**: 481-486
- Worcel A, Han S, Wong M** (1978) **Assembly of newly replicated chromatin.** *Cell* **15**: 969-977
- Xu G, Bestor T, Bourc'his D, Hsieh C, Tommerup N, Bugge M** (1999) Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* **402**: 187-191
- Yan L, Fu D, Li C, Blechl A, Tranquili G, Bonafede M, Sanchez A, Valarik M, Yasuda S, Dubcovsky J** (2006) The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of *FT*. *PNAS* **103**: 19581-19586

- Yoshida M, Nomura S, Beppu T** (1987) Effects of trichostatins on differentiation of murine erythroleucemia cells. *Cancer Res* **47**: 3688-3691
- Zeevaart JAD** (2008) Leaf-produced floral signals. *Plant Biology* **11**: 1-7
- Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, Cokus S, Chan S, Chen H, Hendersen I, Shinn P, Pellegrini M, Jacobsen S, Ecker J** (2006) Genome-wide high resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell* **126**: 1189-1201
- Zhao X, Su Y, Cheng Z, Zhang X** (2008) Cell fate switch during in vitro plant organogenesis. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**: 816-824
- Zilberman D, Henikoff S** (2005) Epigenetic Inheritance in *Arabidopsis*: Selective Silence. *Current Opinion in Genetics and Development* **15**: 557-562
- Zilberman D, Gehring M, Tran RK, Ballinger T, Henikoff S** (2007) Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nature Genetics* **39**: 61-69





## Marie-Véronique Gentil

### Contrôle épigénétique du risque de montaison chez une plante de grande culture : la betterave sucrière. Mise au point d'une stratégie de caractérisation d'épiplèles associés à la sensibilité à la montaison en vue de l'élaboration d'un test de sélection.

Chez les plantes, les processus de développement global et de plasticité développementale sont contrôlés par des mécanismes épigénétiques. La méthylation de l'ADN peut présenter un polymorphisme (épiplèles) qui est une source possible de biomarqueurs pour la sélection de génotypes d'intérêt agronomique. Pourtant, la recherche de tels biomarqueurs n'a pas encore été initiée.

Dans ce contexte, nos objectifs ont concerné l'élaboration d'une stratégie pour la mise en évidence d'un contrôle épigénétique lors d'un processus développemental chez la betterave sucrière (*Beta vulgaris altissima*), ainsi que la recherche des biomarqueurs épigénétiques associés. Cette stratégie a d'abord été appliquée à la morphogenèse *in vitro*, sur trois lignées cellulaires de betterave sucrière. Une relation a pu être établie entre le niveau de méthylation de l'ADN et les propriétés morphogénétiques des lignées. Des biomarqueurs de morphogenèse *in vitro* ont ainsi été identifiés. La même stratégie a ensuite été appliquée *in planta* à la même espèce. L'existence d'un contrôle épigénétique lors de la vernalisation et de la dévernalisation chez plusieurs hybrides de betterave sucrière, avec des sensibilités à la montaison différentes, a été démontrée. Nous suggérons que l'amplitude et la cinétique des variations épigénétiques contrôlent l'induction de la montaison et sa rapidité, confirmant ainsi le rôle de la méthylation de l'ADN dans ce processus. Les loci cibles de ces remaniements de la méthylation de l'ADN lors de la vernalisation ont été définis. Un criblage a enfin permis d'identifier de potentiels biomarqueurs épigénétiques de la sensibilité à la montaison en vue de la mise au point d'un futur test de sélection agronomique.

**Mots clés :** *Épigénétique, betterave sucrière, vernalisation, méthylation de l'ADN, biomarqueurs*

### Epigenetic control of the bolting risk in a crop plant: sugar-beet. The development of a strategy to characterize epialleles associated with bolting sensitivity, with a view to implementation as a selection tool.

In plants, the processes of global development and of developmental plasticity are controlled by epigenetic mechanisms. Polymorphism in DNA methylation (leading to epialleles) is a possible source of biomarkers for the selection of genotypes of agronomic interest. Until now, however, the search for such biomarkers has not been undertaken.

Against this background, our objectives were to develop a strategy to investigate the existence of epigenetic control during a developmental process in sugar-beet (*Beta vulgaris altissima*) and to search for associated epigenetic biomarkers. The strategy was first applied to three sugar-beet cell lines, where we were able to establish a relationship between the level of DNA methylation and the morphogenetic status of the lines, and thus to identify a number of biomarkers for *in vitro* morphogenesis. We then applied the same strategy *in planta* in the same species and demonstrated the existence of epigenetic control (DNA methylation) during vernalization and devernialization in several sugar-beet hybrids that differed for bolting susceptibility. We propose that the scale and kinetics of epigenetic modifications control the induction and the rapidity of bolting, confirming the role of DNA methylation in this process. We have identified a number of target loci for these changes in DNA methylation during vernalization, and by screening these we have been able to select several potential epigenetic biomarkers for bolting susceptibility, which may prove useful in future beet improvement programmes.

**Key words:** *Epigenetic, sugar-beet, vernalization, DNA methylation, biomarkers*



Laboratoire de Biologie des Ligneux et des  
Grandes Cultures, UPRES EA 1207- INRA,  
USC2030 Arbres et Réponses aux Contraintes  
Hydrique et Environnementales

