

Role of tissue mechanics in plant morphogenesis

Subject eligible for INRA funding

Date : 16/03/2009

Thesis subject : "Role of tissue mechanics in plant morphogenesis"

Laboratory 1
INRA - BV
Centre Versailles
Unité UR501, Biologie cellulaire
Route de Saint Cyr 78026 Versailles, cedex
Thesis supervisor 1 : Alexis Peaucelle, Herman Höfte (Parois primaire)

Laboratory 2
Université Paris VII
Laboratoire Matière et Systèmes Complexes (MSC)
Unité UMR 7057
Bat. Condorcet case 7056.
10, Rue Alice Domont et Léonie Duquet
75205 Paris cedex 13
Thesis supervisor 2 : Atef Asinasios, HDR

Before sending candidature, please contact supervisor :
Alexis Peaucelle, 01 30 83 33 49, alexis.peaucelle@versailles.inra.fr

Profile and subjects :
Masters biologie moléculaire et physiologie végétale, physique avec intérêt pour la biologie.
Biologie du développement, Physique : rhéologie

Summary of project

This project is at the interface between developmental biology and physics. The objective is to study the role of tissue mechanics in plant morphogenesis. Two processes will be studied in the model plant *Arabidopsis thaliana* : the formation of primordia in the apical meristem and leaf morphogenesis. In these two systems, we will study in particular the role of the modification of a family of cell wall polymers, the pectins, in the changes in tissue mechanics during morphogenesis.

Scientific and interdisciplinary stakes

La morphogenèse peut être approchée de deux points de vues. Soit on considère le rôle central de gènes et de molécules de signalisation mobiles (morphogènes) qui agissent sur des cellules individuelles en modifiant leurs caractéristiques (identité et croissance). Soit, d'un point de vue physique, les cellules et les tissus constituant alors des structures avec des caractéristiques mécaniques qui influent sur les patrons développementaux. Des études récentes visant à comprendre la formation de primordia dans le méristème apical et la phyllotaxie ont montré l'importance à la fois des réseaux de gènes et d'un morphogène, l'auxine, et les forces mécaniques dans la morphogenèse végétale. Ce projet vise à approfondir notre compréhension du lien entre l'expression génique, la modification chimique de la paroi cellulaire, le changement dans les caractéristiques mécaniques du tissu et la morphogenèse chez les plantes. Le projet se focalisera sur deux systèmes : la formation de primordia dans le méristème apical et la morphogenèse foliaire.

La formation de primordia dans le méristème : gènes et morphogène

La formation des nouveaux organes aériens est initiée par une structure spécialisée appelée le méristème apical caulinaire. Ce petit groupe de cellules en prolifération hautement organisé maintient en son centre une population de cellules souches assurant sa permanence tout en initiant de façon continue des primordia d'organes sur ses flancs [1]. Des progrès importants ont été réalisés au cours des dernières années révélant un réseau de régulation complexe

de l'activité méristématique faisant intervenir des facteurs de transcription et des voies de signalisation hormonales ou par petits peptides. De nombreuses évidences montrent que le site d'apparition d'un primordium d'organe est déterminé par un pic locale d'activité auxine résultant d'un transport polarisé de cette hormone de cellule en cellule dans l'apex grâce à une panoplie de transporteurs d'efflux et d'influx [2-4]. Ainsi la réduction de ce transport polarisé suite à l'inactivation d'un transporteur d'efflux PIN1 conduit à une absence de formation d'organes qui peut être rétablie par une application locale de l'hormone. Un élément central du recrutement des cellules méristématiques au sein des primordia est la disparition de l'expression des gènes KNOX [5]. Les gènes KNOX comme par exemple SHOOT MERISTEMLESS chez *Arabidopsis* codent pour des protéines à homéodomains et forment des complexes avec d'autres protéines à homéodomains codées par les gènes de la famille BEL. Cette répression des gènes KNOX est médiée par l'auxine en conjonction avec des facteurs de transcription de type MYB de la famille ARP [1]. L'expression ectopique des gènes KNOX dans les feuilles conduit à une profonde altération de leur morphologie [6]. Une autre étape importante, probablement également contrôlée par l'auxine est la mise en place d'un domaine frontière séparant le primordium du méristème et des primordia voisins [7]. Ces domaines frontières sont déterminés de façon partiellement redondante par les gènes CUC1-3 (CUP-SHAPED COTYLEDON) [8]. Ils sont régulés de façon post-transcriptionnelle par un miARN, miR164 dont l'action est nécessaire pour limiter l'élargissement du domaine frontière autour des primordia [9, 10].

La morphogenèse foliaire : l'histoire se répète

Les primordia d'organes ainsi formés peuvent se développer en feuilles qui sont classées en feuilles simples lorsqu'elles comprennent un limbe unique ou en feuilles composées lorsque formées par plusieurs folioles [11]. Le bord de chaque feuille ou foliole peut lui même être plus ou moins découpé. Les éléments régulateurs décrits plus haut pour le méristème sont utilisés à nouveau lors de la morphogenèse foliaire. Ainsi des accumulations locales d'auxine sont associées et nécessaires à la formation des dentelures de la feuille d'*Arabidopsis* ou des folioles de la cardamine, une brassicaceae voisine d'*Arabidopsis* formant des feuilles composées [12, 13]. Les gènes CUC définissent également les frontières des dissection des dentelures ou des folioles et leur inactivation conduit à un lissage des marges foliaires et une fusion des folioles [14, 15]. miR164 contrôle l'activité des gènes CUC dans le contexte foliaire tout comme dans l'apex [14]. Cette conservation des réseaux génétiques entre feuilles et méristèmes est exacerbée dans les cas des feuilles composées. En effet le module KNOX/ARP est essentiel pour la formation des folioles et leur placement [12, 16-18]. Dans le cas de la plupart des feuilles composées les gènes KNOX sont à nouveau exprimés et sont nécessaires à la formation des folioles. Cette réutilisation de modules méristématiques lors de la morphogenèse des feuilles composées est en accord avec l'hypothèse qu'il s'agirait de structures homologues à une tige où les folioles correspondraient aux feuilles [11]. Bien que les feuilles simples ne puissent pas être ainsi comparées à une tige, le développement de leur marge fait aussi appel à des modules régulateurs méristématiques.

Un rôle pour la mécanique de la paroi cellulaire dans la morphogenèse

Comment les patrons générés par les réseaux génétiques décrits ci-dessus conduisent à la formation des organes latéraux dans l'apex, les folioles dans les feuilles composées ou les dents sur les marges foliaires reste encore très mal connu. Il semble que la modification des caractéristiques de la paroi soit un des éléments-clé de cette morphogenèse. L'expansine (protéine pariétale contrôlant la cohésion des microfibrilles de cellulose) est impliquée dans la formation des primordia et la morphogenèse de la feuille [19, 20]. Une application locale au niveau du méristème permet une croissance plus rapide des primordia et au niveau de la feuille la formation d'un lobe chez le tabac. Récemment au sein du laboratoire nous avons montré qu'un autre élément de la paroi est important pour la morphogenèse. La déméthylesterification des homogalacturonanes est nécessaire et suffisante pour former un primordium [21]. Cette modification est contrôlée par les pectine méthylestérases (PME, 66 gènes dans le génome d'*Arabidopsis*) elles-mêmes régulées par les Pectine MéthylEstérase Inhibiteurs (PMEI, 69 gènes dans le génome d'*Arabidopsis*). Selon nos données préliminaires, la déméthylesterification des homogalacturonanes semble permettre la formation du futur organe latéral en ramollissent les parois comme le montrent des analyses par microscopie à force atomique (AFM). Parallèlement, nous avons montré que le mutant pennywise (pny) affectant un gène de type BEL partenaire des KNOX [22, 23] présente un défaut de l'organogenèse associé à une expression ectopique d'une PME (données non publiées). De plus, le mutant pny peut également être partiellement corrigé en modifiant l'activité des gènes CUC [24]. L'ensemble de ces observations indiquent un lien étroit entre les gènes de patterning CUC et BEL/KNOX, modifications pariétales et organogenèse.

Objectifs de la thèse

- Déterminer le rôle de la dé-méthylesterification des pectines et la mécanique des tissus dans la formation des primordia foliaires et des dents et folioles de la feuille.
 - a. o Utiliser l'AFM pour mesurer des propriétés mécaniques des tissus.
 - b. o Manipuler la quantité et le degré de méthylesterification des pectines dans différentes couches cellulaires et évaluer l'effet sur les propriétés mécaniques des tissus et la formation de primordia.
- Déterminer le lien entre la signalisation par l'auxine et la dé-méthylesterification des pectines.

Références :

1. Carraro, N., et al., Cell differentiation and organ initiation at the shoot apical meristem. *Plant Mol Biol*, 2006. 60(6): p. 811-26.
1. 2. Reinhardt, D., T. Mandel, and C. Kuhlemeier, Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell*, 2000. 12(4): p. 507-18.

2. 3. Reinhardt, D., et al., Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature*, 2003. 426(6964): p. 25560.
1. 4. Vernoux, T., et al., PIN-FORMED 1 regulates cell fate at the periphery of the shoot apical meristem. *Development*, 2000. 127(23): p. 5157-65.
2. 5. Barkoulas, M., et al., From genes to shape: regulatory interactions in leaf development. *Curr Opin Plant Biol*, 2007. 10(6): p. 660-6.
3. 6. Lincoln, C., et al., A knotted1-like homeobox gene in Arabidopsis is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. *Plant Cell*, 1994. 6(12): p. 1859-76.
4. 7. Aida, M. and M. Tasaka, Morphogenesis and patterning at the organ boundaries in the higher plant shoot apex. *Plant Mol Biol*, 2006. 60(6): p. 915-28.
8. Aida, M. and M. Tasaka, Genetic control of shoot organ boundaries. *Curr Opin Plant Biol*, 2006. 9(1): p. 72-7.
1. 9. Mallory, A.C., et al., MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. *Curr Biol*, 2004. 14(12): p. 1035-46.
2. 10. Laufs, P., et al., MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in Arabidopsis meristems. *Development*, 2004. 131(17): p. 4311-22.
11. Champagne, C. and N. Sinha, Compound leaves: equal to the sum of their parts? *Development*, 2004. 131(18): p. 4401-12.
1. 12. Barkoulas, M., et al., A developmental framework for dissected leaf formation in the Arabidopsis relative *Cardamine hirsuta*. *Nat Genet*, 2008. 40: p. 1136-1141.
2. 13. Hay, A., M. Barkoulas, and M. Tsiantis, ASYMMETRIC LEAVES1 and auxin activities converge to repress BREVIPEDICELLUS expression and promote leaf development in Arabidopsis. *Development*, 2006.
3. 14. Nikovics, K., et al., The Balance between the MIR164A and CUC2 Genes Controls Leaf Margin Serration in Arabidopsis. *Plant Cell*, 2006. 18(11): p. 2929-45.
4. 15. Blein, T., et al., A conserved molecular framework for compound leaf development. *Science*, 2008. 322(5909): p. 1835-9.
5. 16. Bharathan, G., et al., Homologies in leaf form inferred from KNOX1 gene expression during development. *Science*, 2002. 296(5574): p. 1858-60.
6. 17. Hareven, D., et al., The making of a compound leaf: genetic manipulation of leaf architecture in tomato. *Cell*, 1996. 84(5): p. 735-44.
7. 18. Kim, M., et al., The expression domain of PHANTASTICA determines leaflet placement in compound leaves. *Nature*, 2003. 424: p. 438-443.
8. 19. Pien, S., et al., Local expression of expansin induces the entire process of leaf development and modifies leaf shape. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(20): p. 11812-7.
9. 20. Fleming, A., et al., Induction of Leaf Primordia by the Cell Wall Protein Expansin *Science*. *Science*, 1997. 276: p. 1415-1418.
1. 21. Peaucelle, A., et al., Arabidopsis phyllotaxis is controlled by the methyl-esterification status of cell-wall pectins. *Curr Biol*, 2008. 18(24): p. 1943-8.
2. 22. Byrne, M.E., et al., Phyllotactic pattern and stem cell fate are determined by the Arabidopsis homeobox gene BELLRINGER. *Development*, 2003. 130(17): p. 3941-50.
3. 23. Smith, H.M. and S. Hake, The interaction of two homeobox genes, BREVIPEDICELLUS and PENNYWISE, regulates internode patterning in the Arabidopsis inflorescence. *Plant Cell*, 2003. 15(8): p. 1717-27.
24. Peaucelle, A., Dynamique cellulaire et architecture des plantes. 2006, Université de Paris-Sud.

National and international scientific context

Plusieurs équipes étudient le développement des primordia dans le méristème apicale (Jan Traas, Lyon ; Chris Kuhlemeier, Bern ; Eliot Meyerowitz, Caltech) ou le développement foliaire (Andrew Fleming, Sheffield ; Walter Achim, Aachen). L'originalité de notre approche est d'une part d'associer l'étude de ces deux processus du développement qui sont liés dans leur nature et d'autre part, de développer quatre outils en parallèle: des plantes dont la structure pariétale est modifiable ; des méthodes pour la caractérisation des modifications pariétales au niveau cellulaire ; une méthode basée sur l'AFM pour mesurer les modifications mécaniques et enfin le développement de modèles bioinformatiques. Ainsi nous espérons pouvoir proposer un modèle mécanistique qui donnera un éclairage nouveau sur les processus de morphogenèse.

Enjeux d'application

Une meilleure compréhension du rôle du métabolisme pariétal et son influence sur les propriétés mécaniques des tissus est essentielle pour comprendre les réseaux de régulation contrôlant la croissance et l'architecture des végétaux ainsi que le déterminisme génétique des propriétés technologiques des fibres végétaux (bois, textile, papier, matériaux composites). Par ailleurs, les pectines contrôlent l'adhésion cellulaire et la texture des tissus végétaux, jouent un rôle clé dans la maturation des fruits et les interactions plantepathogène, sont des déterminants-clé pour le rouissage des fibres de lin ou de chanvre. Les modifications des pectines déterminent également leurs propriétés d'usage, par exemple dans les formulations alimentaires.

Matériel et données disponibles ou à produire

L'AFM, ainsi que le savoir-faire pour son utilisation pour la mesure des propriétés mécaniques des tissus végétaux sont disponibles au sein de l'équipe d'Yves Couder au laboratoire MSC.

Les lignées d'Arabidopsis permettant de modifier le degré de méthylestérification des pectines, soit dans toute la

plante, soit uniquement dans l'épiderme sont déjà disponibles. Dans ce projet, nous proposons de générer des plantes, dans lesquelles la quantité absolue d'homogalacturonane sera réduite spécifiquement dans l'épiderme ou dans les couches internes.

Lab's publications

- Arditi R., J. Michalski & A.H. Hirzel. 2005. Rheagogies: modelling non-trophic effects in food webs. *Ecological Complexity*, 2, 249-258.
- Loeuille, N. & Loreau, M. (2005) Evolutionary emergence of size-structured food webs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(16): 5761-5766.
- Mounier J., C. Monnet, T. Vallaeys, R. Arditi, A.S. Sarthou, A. Hélias & F. Irlinger. 2008. Microbial interactions within a cheese microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 172-181.
- Tyutyunov Yu., L. Titova & R. Arditi. 2008. Predator interference emerging from trophotaxis in predator-prey systems: an individual-based approach. *Ecological Complexity* 5, 48-58.
- Loeuille, N. & Leibold, M. A. Evolution in metacommunities: on the relative importance of species sorting and monopolization in structuring communities. *The American Naturalist*, 171 (6), 788-799.
- Annexe: références de contexte du sujet proposé
- Coltman, D. W., O'Donoghue, P., Jorgenson, J. T., Hogg, J. T., Strobeck, C. & Fiesta-Bianchet, M. (2003) Undesirable evolutionary consequences of trophy hunting. *Nature*, 426: 655-658.
- Gell, F. R. & Roberts, C. M. (2003) Benefits beyond boundaries: the fishery effects of marine reserves. *Trends in Ecology and Evolution*, 18(9): 448-455.
- Leibold, M. A., Holyoak, M., Mouquet, N., Amarasekare, N., Chase, J. M., Hoopes, M. F., Holt, R. D., Shurin, J. B., Law, R., Tilman, D., Loreau, M. & Gonzalez, A. (2004) The metacommunity concept: a framework for multi-scale community ecology. *Ecology Letters*, 7: 601-613.
- Loeuille, N. & Ghil (2004), M. Intrinsic and climatic factors in north-american animal population dynamics. *BMC Ecology*, 4:6.
- Loeuille, N. & Leibold, M. A. Evolution in metacommunities: on the relative importance of species sorting and monopolization in structuring communities. *The American Naturalist*, 171 (6), 788-799.
- Loeuille, N. & Leibold, M. A. Ecological consequences of evolution in plant defenses in a metacommunity. *Theoretical Population Biology*, 74, 34-45.
- Loeuille, N. & Loreau, M. (2005) Evolutionary emergence of size-structured food webs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(16): 5761-5766.
- Michalski, J., Poggiale, J. C., Arditi, R. & Auger, P. M. (1997) Macroscopic dynamic effects of migrations in patchy predator-prey systems. *Journal of Theoretical Biology*, 185: 459-474.
- Olsen, E. M., Heino, M., Lilly, G. R., Morgan, M. J., Brattey, J., Ernande, B. & Dieckmann, U. (2004) Maturation trends indicative of rapid evolution preceded the collapse of northern cod. *Nature*, 428: 932-935.
- Rosser, A. M. & Mainka, S. E. (2002) Overexploitation and species extinctions. *Conservation Biology*, 16(3): 584-586.
- Tuck, G. N. & Possingham, H. P. (1994) Optimal harvesting strategies for a metapopulation. *Bulletin of Mathematical Biology*, 56(1): 107-127.